

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004 年 5 月 13 日 (13.05.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/039396 A1

- (51) 国際特許分類: A61K 38/46, 45/00, A61P 15/00, 25/28, 31/04, 43/00, C12N 9/64, 15/57
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/013851
- (22) 国際出願日: 2003 年 10 月 29 日 (29.10.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2002-314078
2002 年 10 月 29 日 (29.10.2002) JP
- (71) 出願人 および
(72) 発明者: 近藤 玄 (KONDOH, Gen) [JP/JP]; 〒606-8336
京都府 京都市 左京区岡崎北御所町 1 8 番地 Kyoto (JP).
- (74) 代理人: 西澤 利夫 (NISHIZAWA, Toshio); 〒107-0062
東京都 港区 南青山 6 丁目 11 番 1 号 スリーエフ南青山
ビルディング 7F Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: DRUG CONTAINING ANGIOTENSIN CONVERTASE

(54) 発明の名称: アンギオテンシン変換酵素含有薬剤

(57) Abstract: A drug for preventing or treating prion diseases, bacterial infection, infertility and so on which contains an angiotensin convertase specifically cleaving a GPI anchor of cell membrane or a peptidase-inactivated mutant enzyme thereof and has a function mechanism of releasing a GPI anchor type protein from cell membrane.

(57) 要約: 細胞膜の GPI アンカーを特異的に切断するアンギオテンシン変換酵素もしくはそのペプチダーゼ活性不活性化変異型酵素を含有し、GPI アンカー型タンパク質を細胞膜から遊離させることを作用機序とする、プリオン性疾患、細菌感染疾患または不妊症等の予防または治療用薬剤。

明細書

アンギオテンシン変換酵素含有薬剤

5

技術分野

この出願の発明は、アンギオテンシン変換酵素を含有する薬剤に関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、GPI アンカー型タンパク質を細胞膜から遊離させることを作用機序とし、プリオン性疾患や細菌感染疾患、精子異常による不妊症等の予防または治療に有用な薬剤に関するものである。

10

背景技術

15

アンギオテンシン変換酵素 [angiotensin-converting enzyme : ACE。酵素学的にはジペプチジルカルボキシペプチダーゼ (EC 3.4.15.1)] は、レニン・アンギオテンシン・アルドステロン血圧制御系の一員で、アンギオテンシン I を活性化型のアンギオテンシン II に変換するとともに、ブラディキニンを分解不活性化することによって様々な生理活性の変化（例えば、血圧上昇）を生じさせることが知られている（非特許文献 1）。このため、ACE 阻害を薬理作用とする薬剤（例えば、血圧降下剤）や ACE 阻害剤等の発明が数多く存在する（例えば、特許文献 1 - 4）。

20

一方、細胞の表面を構成する細胞膜はタンパク質と脂質を主成分とし、エネルギーの生産、刺激の伝達、細胞間相互作用、分泌などの多彩な生命機能を営む場である。GPI アンカー型タンパク質は GPI アンカーを介して細胞膜に結合するその主要な構成成分であり、上記の生命機能維持の一翼を担っている重要な分子群である。しかし他方で、細胞膜の GPI アンカーには正常型プリオンタンパク質が結合しており、この正常型プリオンに異常型プリオンが結合するとクロイツフェルト・ヤコブ病、Grestmann-Strausseele 症候群、クルー病等のいわゆる「プリオン性疾患」の原因

30

となる。また、GPI アンカーに結合するリポポリサッカライド (LPS) 受容体 CD14 には菌体毒素 LPS が結合し、細胞障害の原因となっている。

さらに、哺乳類の精子-卵子透明体の結合による受精成立時において、精子細胞膜
5 の GPI アンカーに結合したタンパク質 (マウスの事例では PH-20 や TEPS5 等、非特許文献 2 および 3) の遊離が必須であるが、GPI アンカーからそれらタンパク質の切り離しを行う機能が欠損した異常精子を持つ雄性不妊症が知られている。

従って、プリオン性疾患や細菌感染、精子異常による不妊症等に対する症状の緩和
10 や治療においては、GPI アンカー型タンパク質を細胞膜から遊離させることが有効である。GPI アンカー切断活性 (GPIase 活性) を示すタンパク質としては、哺乳類においては、唯一 GPI-PLD が知られている。しかし、GPI-PLD は細胞内で GPI-PLD を発現する場合に限って、GPIase 活性を示すことが、培養細胞を用いた研究により報告されている (非特許文献 4)。すなわち GPIase 活性の医薬への利用という
15 観点から、外来性の GPI-PLD は有効に作用した事例がない。

なお、ACE はアンギオテンシン I およびブラディキニン以外の基質、例えばエンケファリン、ならびにヘプタペプチドおよびオクタペプチドのエンケファリン前駆体を切断する。また、トリデカペプチド、ニューロテンシンをジペプチドおよびウンデ
20 カペプチドに加水分解し、さらにはサブスタンス P を切断不活性化することが知られている (非特許文献 5)。しかしながら、ACE が GPI アンカー型タンパク質を細胞表面から GPI アンカータンパク質から切断遊離することは、従来、全く知られていない。

25 特許文献 1 : 特開平 10-036391 号公報

特許文献 2 : 特開 2001-064299 号公報

特許文献 3 : 特開 2001-233789 号公報

特許文献 4 : 特開 2002-138100 号公報

非特許文献 1 : Hooper et al., Int. J. Biochem. 23:641-647, 1991

30 非特許文献 2 : Honda et al., J. Biol. Chem. 277:16976-16984, 2002

非特許文献 3 : Lin et al., J. Cell Biol. 125:1157-1163, 1994

非特許文献 4 : Tujioka et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 251:737-747, 1998

非特許文献 5 : Skidgel et al., Neuropeptides and Their Prptidases, Turner AJ
5 Ed., Chichester, UK, 1989

発明の開示

- 10 この出願の発明者は、GPI アンカー型タンパク質遊離活性を有する物質を探索し、
この物質がアンギオテンシン変換酵素（ACE）であることを見出した。

この発明は、発明者による以上のとおりの新規な知見に基づくものであり、有害な
GPI アンカー型タンパク質を細胞膜から遊離させることによって各種疾患を予防また
15 は治療するための新規薬剤を提供することを課題としている。

さらに、従来 ACE は既知の生理活性（たとえば血圧上昇などをおこすペプチダー
ゼ活性）が有害であることから、それを抑制するための研究が多様に行われてきてい
た。ACE を実用的薬剤として提供するにあたり、この出願の発明者は有害なペプチ
20 ダーゼ活性を抑制し、目的とする GPI アンカー型タンパク質遊離活性のみを有効に
利用しうる ACE を提供することを課題としている。

この出願は、前記の課題を解決するための発明として、アンギオテンシン変換酵素
を含有し、GPI アンカー型タンパク質を細胞膜から遊離させることを作用機序とする
25 アンギオテンシン変換酵素含有薬剤を提供する。

この発明の薬剤は、好ましくは、プリオン性疾患、細菌感染疾患または精子異常に
よる不妊症の予防または治療用としての薬剤である。

30 この発明の薬剤の一つの態様は、含まれるアンギオテンシン変換酵素が、GPI アン

カー型タンパク質遊離活性を保持させたまま、アンギオテンシン変換酵素活性を失活させるアミノ酸変異を導入した変異型酵素、好ましくはそのアミノ酸配列中の His Glu Met Gly His 配列におけるいずれか 1 以上のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換した変異酵素、さらに好ましくはそのアミノ酸配列中の His Glu Met Gly His 5 配列における Glu を Asp に置換した変異型酵素を含む薬剤である。

この出願はまた、GPI アンカー型タンパク質遊離活性を保持させたまま、アンギオテンシン変換酵素活性を失活させるアミノ酸変異を導入した変異型アンギオテンシン変換酵素を提供する。

10

この変異型酵素は、そのアミノ酸配列中の His Glu Met Gly His 配列におけるいずれか 1 以上のアミノ酸残基、好ましくは His Glu Met Gly His 配列における Glu を Asp に置換した酵素である。

15 この発明において、「GPI アンカー型タンパク質」とは、細胞膜の GPI アンカーに結合するタンパク質であり、例えば、プリオン性疾患に関係する正常型または異常型プリオン、菌体毒素 LPS の受容体 CD14 等である。

「GPI アンカー型タンパク質を細胞膜から遊離させる」とは、細胞膜の GPI アンカーに結合している GPI アンカー型タンパク質を GPI アンカーから切断分離させて、20 不活性化させることを意味する。これによって、例えば GPI アンカー型タンパク質である正常型プリオンが細胞膜から遊離され、正常型プリオンに結合してプリオン性疾患の原因となる異常型プリオンが細胞膜に結合することが防止される。また、菌体毒素 LPS の受容体 CD14 が細胞膜から遊離されるため、膜型 CD14-LPS 複合体の 25 形成が阻害され、LPS による細胞障害や炎症反応の拡大が防止または改善される。

「プリオン性疾患」は、例えば、クロイツフェルト・ヤコブ病、Grestmann-Straussle 症候群、クルー病等である。

30 「細菌感染疾患」は、例えば、グラム陰性菌（大腸菌、インフルエンザ桿菌、サル

モネラ菌、髄膜炎菌、緑膿菌等)による感染症であり、またそれらの細胞毒によるエンドトキシンショック等の炎症性疾患等である。

「精子異常による不妊症」は、たとえば TEPS5 や PH-20 等の精子細胞膜表面に存在する GPI アンカー型タンパク質を、卵との会合時に遊離できないことによる受精不成立を特徴とする精子異常を示す雄性の不妊症である。

なお、この発明を実施するために使用する様々な技術は、特にその出典を明示した技術を除いては、公知の文献等に基づいて当業者であれば容易かつ確実に実施可能である。例えば、薬剤の調製は Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, ed. A. Gennaro, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990、遺伝子工学および分子生物学的技術は Sambrook and Maniatis, in Molecular Cloning-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989; Ausubel, F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y, 1995) 等に記載されている。

図面の簡単な説明

図 1 は、EGFP-GPI 遺伝子導入マウスの精巣における蛍光局在化を観察した顕微鏡像である。EGFP-GPI の生殖細胞 (Gc) 発現は第 2 系統 (Lane 2) マウスに見られたが、第 1 (示さず) および第 3 系統マウスには見られなかった。Ly はライディヒ細胞。倍率は 200 倍。

図 2 は、EGFP-GPI 遺伝子導入マウスの精巣における EGFP-GPI タンパク質の溶解度を調べた電気泳動像である。界面活性剤を添加した溶解緩衝液 (Tx-114+) または界面活性剤非添加の溶解緩衝液 (Tx-114-) を用いて組織を可溶化し、溶解産物の一部をウエスタンブロット解析した。EGFP-GPI が界面活性剤非存在下で積極的に可溶化したのは、第 2 系統マウスの精巣においてのみであった。水溶性タンパク質の大きさ (Ln.2, Tx-114-) が界面活性剤可溶性の膜アンカータンパク質 (Ln.2,

Tx-114+) と同等であった点は特記すべきである。F9 は F9 トランスフェクタント、NTg は対照としての非トランスジェニックである。

図 3 は、連続液体クロマトグラフィーにより精製された GPI アンカータンパク質
5 遊離活性を示す分子。TSK gel 3000SW ゲルろ過カラムから溶出したピーク分画 (Frac.) より、SDS-PAGE と銀染色によって、100kDa の単一バンドとして単離された。

図 4 は、精製組換え ACE (ACE-T) 市販製品 (ACE-S)、PI-PLC およびバッ
10 ーのみと反応させた PLAP のイムノブロットティング。Input は反応の基質である。

図 5 は、ACE 反応の用量依存性を測定した結果である。部分精製した PLAP を
様々な濃度の ACE-S と反応させ、水溶相の PLAP 活性を測定した。値は平均値 ±
SD、n=3 である。0 mU/ml を対照とした。Student's t 検定による有意差水準は、
15 *: P<0.01、**: p<0.05 である。最下段は 10⁻³M カプトプリルを添加した場合の反
応である。

図 6 は、ACE と反応させた PLAP のイムノブロットティングによる GPI アンカー型
タンパク質遊離活性の測定結果である。E414D はペプチダーゼ活性中心の Glu414
20 を Asp に置換した変異体 ACE、WT は野生型の ACE-T。Buffer は PLAP をバッ
ーのみと反応させた対照。活性のユニット数は表.1 に示す方法で求めた。Input
は反応の基質である。

図 7 は、ペプチダーゼ活性 (Pase) の測定結果。E414D はペプチダーゼ活性中心
25 の Glu414 を Asp に置換した変異体 ACE、WT は野生型の ACE-T。活性測定手順は
Kasahara and Ashihara, Clin Chem. 27:1922-1925 に記載された測定方法に従
った。

図 8 は、filipin 前処理 (右) または非処理 (左) 条件下で、EGFP-GPI をトラン
30 スフェクションした F9 細胞を 1.0 U/ml の ACE-S により処理し、EGFP-GPI、

Sca-1、Thy-1 および E-カドヘリンの細胞表面発現を FACS 分析した結果である。filipin 処理後には GPI アンカータンパク質の発現は減少していたが（細胞数の左シフト）、膜貫通型 E-カドヘリンは減少していないことが分かり、またそれらの程度は異なっていた（遊離%：EGFP-GPI は 53%、Sca-1 は 67%、Thy-1 は 34%）。

- 5 a は ACE(-)、b は ACE (+)、c は PI-PLC 処理を行ったもの。各ラインの数値は中央値 (Mean) である。

図 9 は、EGFP-GPI を発現する F9 細胞へ ACE または PI-PLC 処理を行った場合に観察される GFP 蛍光の顕微鏡写真。ACE は EGFP-GPI を細胞表面から切断している。ゴルジ体の GFP 蛍光は減衰していない。倍率 200 倍。「PBS」は ACE および PI-PLC 未処理の対照である。

図 10 は、HeLa 細胞を filipin 前処理（右）または非処理（左）で、1.0U/ml の ACS-S または 2.8U/ml の PI-PLC を用いて処理し、細胞表面の CD59 および DAF の発現を FACS 分析した結果である。ACE 処理によってタンパク質の発現は減少したが（細胞数の左シフト）、その程度は異なっていた（CD59 は 66%、filipin 処理後の DAF は 58%）。

図 11 上図は、プリオンタンパク質 (PrP) を結合した HEK293 細胞を 1.0 U/ml の ACE-S により処理し、プリオンタンパク質の遊離を FACS 分析した結果である。下図は、対照として CD59 の遊離を分析した結果である。

図 12 は filipin 処理を行った HeLa 細胞を様々な濃度の ACE-S 存在下でインキュベートし、CD59 の細胞表面発現を FACS 分析し、遊離%を算出した結果である。値は平均値±SD、n=3 である。0 U/ml を対照とした。Student' s t 検定による有意差水準は、* : P<0.005、** : p<0.01 である。

図 13 は filipin 処理した HeLa 細胞を、表示されたカプトプリル用量の存在下、10⁻⁷ M の ACE ペプチドに相当する 0.2U/ml の ACE-S と共にインキュベートし、CD59 の細胞表面発現を FACS 分析した結果である。値は平均値±SD、n=3 である。

カプトリル 0 M を対照とした。Student's t 検定による有意差水準は、* : $P < 0.01$ 、** : $p < 0.05$ である。

図 14 は、各種の細胞における ACE の各種タンパク質の遊離活性を比較した。図 8、図 10 および図 11 の結果の要約となる。ACE は膜タンパク質である E-カドヘリンを除き、様々な内在性 GPI アンカー型タンパク質を切断放出する。EGFP-GPI を発現する F9 細胞では EGFP-GPI、Sca-1、Thy-1 および E-カドヘリンを、HeLa 細胞では CD59 および DAF を、HEK293 細胞では CD59 とプリオンタンパク質 (PrP) をそれぞれ FACS 分析で解析した。値は平均値 \pm SD、 $n=3$ である。ND は未測定である。

図 15 は、遊離タンパク質中に含まれる GPI アンカー型断片の同定。EGFP-GPI を発現する F9 細胞を ^{32}P リン酸もしくは ^3H エタノールアミンで代謝ラベルし、フィリピンを処理を行った後に、ACE-S、PI-PLC または mGK (マウス腺性カリクレイン) による処理を行った。遊離された EGFP-GPI タンパク質を抗 GFP 抗体で精製、SDS-PAGE で分離後、ニトロセルロース膜に転写した。遊離した EGFP-GPI タンパク質の総量は EGFP イムノプロットによる検出バンドの強度により求めた。また放射線解析では矢印で示した部分で同一のバンドが確認された。タンパク質重量あたりの放射線強度を計算し、ACE 処理サンプルを 1.0 として遊離したタンパク質に含まれるそれぞれの標識化合物の相対量として表示した。ACE 処理サンプルでは Rapid migrating band がいくつか認められるが、これは F9 細胞中に存在する何らかの酵素による切断によるものである。

図 16 は、GPI アンカー糖鎖骨格におけるリン酸およびエタノールアミンの結合部位、および PI-PLC、GPI-PLD、mGK の切断部位を示した模式図である。Man はマンノース、GlcNc はグルコサミン、Ino はイノシトール、黒い太線は脂肪鎖を示す。

図 17 は、正常マウスおよび ACE ノックアウトマウス精巣上体由来の精子を、水溶性画分 X すなわちアクロソームなどの水溶性成分 (WS) と、細胞膜を構成するタンパク質などの界面活性剤可溶性 (難水溶性) 画分 (DS) に分配し、SDS-PAGE

により分離し、それぞれの抗体を用いてイムノブロットを行った。アクロシンおよびファーターリンβは、ともに精子Xに存在し、それぞれ WS、DS の指標タンパク質として用いた。理由は不明だが、ACE ノックアウトマウス精子ではファーターリンβの発現が正常マウス精子での発現にくらべて低くなっている。+/+は正常精子、-

5 /-は ACE ノックアウト精子を示す。

図 18 は、ACE ノックアウトマウス精子に対して、様々な処理を行ったのちに精子を卵（透明体）へ結合させた顕微鏡写真。倍率は 200 倍。前処理に使用した物質はそれぞれの写真に示した。ACE-WT は野生型 ACE、ACE-E414D はペプチダーゼ
10 活性を不活性化させた変異体 ACE、Inositol-P は PI-PLC の阻害剤である。Buffer は前処理にバッファーを用いる対照実験である。

図 19 は、図 18 における卵に結合した精子の数をグラフ化したものである。値は平均±SE（標準誤差）で、平均値をグラフ上に数値で示した。凡例は図 18 に同じ
15 である。それぞれの実験を行った卵子の数はそれぞれ、Buffer が 18、ACE-WT が 20、ACE-E414D が 17、PI-PLC が 18、PI-PLC+Inositol-P は 18、Inositol-P が 17 である。student's t 検定による有意差水準は、対照実験（Buffer）と比較して、*：P<0.005、**：p<0.01 である。また ACE-WT と ACE-E414D 間では P<0.3、ACE-WT と PI-PLC 間では P<0.5、PI-PLC と PI-PLC+Inositol-P 間では P<0.05
20 であった。これとは別個に行った実験でも同様の結果を得た。

発明を実施するための最良の形態

25 この発明において使用する ACE は、ヒトをはじめとする各種哺乳動物の細胞（体細胞や精巢細胞）から公知の方法によって単離することができる（体細胞型 ACE-S、精巢型 ACE-T）。また、市販品（例えば、ウサギ肺由来の ACE-S：Sigma A-6778 等）や、特表 2002-525108 号公報に開示されているアンギオテンシン変換酵素相同物を使用することもできる。さらに、この ACE は各種の動物から単離されたもの
30 がそれぞれのアミノ酸配列およびそれをコードするポリヌクレオチド（cDNA 配列）

と共に以下のとおりに知られている。すなわち、ヒト ACE-S (GenBank/J04144)、ヒト ACE-T (GenBank/M26657)、ヒト ACE アイソフォーム 3 前駆体 (GenBank/NM_152831)、ヒト ACE アイソフォーム 2 前駆体 (GenBank/NM_152830)、ヒト ACE アイソフォーム 1 前駆体 (NM_000789)、
5 ヒト ACE 様タンパク質 (GenBank/NM_021804)、マウス ACE-T (GenBank/NM_009598)、マウス ACE-S (GenBank/XM_110936)、ラット ACE (GenBank/NM_012544)、ラット肺由来 ACE (GenBank/NM_012544)、ラット ACE-T (GenBank/AF539425)、ウサギ ACE-T (Swissprot/P22968)、ウサギ ACE-S (Swissprot/P12822)、ニワトリ (GenBank/Q10751)、ウシ
10 ACE (Swissprot/1919242A)、イエバエ ACE 前駆体 (Swissprot/I0715)、ショウジョウバエ ACE (GenBank/NM_165070) 等である。従って、この発明で使用する ACE は、前記の公知アミノ酸配列に基づいて公知の固相ペプチド合成法により化学合成して作製することもできる。あるいは、ACE をコードするポリヌクレオチドを *in vitro* 転写翻訳系や適当な宿主-ベクター系で発現させることによって、
15 組換え ACE として取得することができる。ポリヌクレオチド (例えば ACE cDNA) は前記 GenBank データベースや特表 2002-525108 号公報の塩基配列情報に基づき作製したオリゴヌクレオチドプローブを用いて既存の cDNA ライブラリーをスクリーニングする方法や、オリゴヌクレオチドプライマーを用いた RT-PCR 法等の公知の方法により取得することができる。

20

例えば組換え ACE を *in vitro* 転写翻訳で作製する場合には、前記ポリヌクレオチドを、RNA ポリメラーゼプロモーターを有するベクターに挿入して発現ベクターを作製し、このベクターを、プロモーターに対応する RNA ポリメラーゼを含むウサギ網状赤血球溶解物や小麦胚芽抽出物などのインビトロ翻訳系に添加する。RNA ポリ
25 メラーゼプロモーターとしては、T7、T3、SP6 などが例示できる。これらの RNA ポリメラーゼプロモーターを含むベクターとしては、pKA1、pCDM8、pT3/T7 18、pT7/3 19、pBluescript II などが例示できる。

組換え ACE を、大腸菌などの微生物で発現させる場合には、微生物中で複製可能なオリジン、プロモーター、リボソーム結合部位、DNA クローニング部位、ターミ
30 ネーター等を有する発現ベクターに前記の DNA 断片を組換えた発現ベクターを作成

し、培養物から融合ペプチドを単離する。大腸菌用発現ベクターとしては、pUC 系、pBluescript II、pET 発現システム、pGEX 発現システムなどが例示できる。

また組換え ACE を真核細胞で発現させる場合には、前記の融合ポリヌクレオチド
5 を、プロモーター、スプライシング領域、ポリ(A)付加部位等を有する真核細胞用発
現ベクターに挿入して組換えベクターを作成し、真核細胞内に導入すれば、融合ペプ
チドを形質転換真核細胞で発現させることができる。発現ベクターとしては、pKA1、
pCDM8、pSVK3、pMSG、pSVL、pBK-CMV、pBK-RSV、EBV ベクター、pRS、
pCDNA3、pMSG、pYES2 などが例示できる。真核細胞としては、サル腎臓細胞
10 COS7、チャイニーズハムスター卵巣細胞 CHO などの哺乳動物培養細胞、出芽酵母、
分裂酵母、カイコ細胞、アフリカツメガエル卵細胞などが一般に用いられるが、目的
とするタンパク質を発現できるものであれば、いかなる真核細胞でもよい。

発現ベクターを宿主細胞に導入するには、電気穿孔法、リン酸カルシウム法、リポ
15 ソーム法、DEAE デキストラン法など公知の方法を用いることができる。

融合ペプチドを原核細胞や真核細胞で発現させたのち、培養物から組換え ACE を
単離精製するためには、公知の分離操作を組み合わせる行うことができる。例えば、
尿素などの変性剤や界面活性剤による処理、超音波処理、酵素消化、塩析や溶媒沈殿
20 法、透析、遠心分離、限外濾過、ゲル濾過、SDS-PAGE、等電点電気泳動、イオン
交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラ
フィー、逆相クロマトグラフィーなどが挙げられる。

またこの発明において使用する ACE は、GPI アンカー型タンパク質遊離活性を保
25 持させたまま、アンギオテンシン変換酵素活性（血圧上昇等のペプチダーゼ活性）を
失活させるアミノ酸変異を導入した変異型 ACE であってもよい。すなわち、ACE は
血圧制御因子として働き、血圧上昇を引き起こす。そのため ACE を投与した場合に
は、その主作用としての GPI アンカー型タンパク質遊離とともに、副作用としての
血圧上昇等を引き起こす危険性がある。この発明の変異型 ACE は、1 または複数の
30 アミノ酸残基を欠失または付加、若しくは他のアミノ酸残基に置換することによって、

目的とする主作用を保持したまま、好ましくない副作用を低減または消失させることを可能とする。

変異型 ACE は、公知の ACE アミノ酸配列（例えば配列番号 4）に基づき、公知
5 の固相ペプチド合成法（例えば Organic Syntheses Collective Volumes, Gilman, et al. (Eds) John Wiley & Sons, Inc., NY）に従って様々な変異型ペプチドを作製し、あるいは変異導入型の PCR 法や公知の Kunkel 法（Kunkel, T. A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488, 1985 および Kunkel, T. A., et al. Methods in Enzymology 154:367, 1987）に従って作製した変異型ポリヌクレオチドを適当な宿主ベクター系で発現させることによ
10 って様々な変異型ペプチドを作製し、後記の試験方法によってそのペプチダーゼ活性および GPIase を試験することによって、目的とする変異型を得ることができる。

従って、変異型 ACE のアミノ酸変異導入部位は適宜に設計することができるが、この発明では、その一例として、ACE アミノ酸配列における His Glu Met Gly His
15 配列（配列番号 4 の 413-417 位）のいずれか 1 以上のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換した変異型 ACE を好ましいものとして例示する。すなわちこの配列領域は、ACE のペプチダーゼ活性に必須な Zn の配位に深く関係する配列であり、哺乳類（ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ウシ）、鳥類（ニワトリ）、昆虫（ハエ）など、現在報告されている ACE において、ACE-T および ACE-S 問わず、ほぼ完全に保存
20 されている。そしてこの発明においては、特に好ましい変異型 ACE として、Glu Met Gly His 配列における Glu を Asp に置換した変異型 ACE（以下「ペプチダーゼ活性欠損 ACE（E414D）」と記載することがある）を提供する。

この発明の薬剤は、実施的に ACE 単独であってもよいが、疾患の種類や薬剤の投
25 与形態に応じて、薬剤的に許容される担体と混合して調製することが好ましい。すなわち、この発明の薬剤は、非経口的または経口的な投与に適した剤型となるような担体と混合することができる。

非経口投与は、局所注入、腹腔内投与、選択的静脈内注入、静脈注射、皮下注射、
30 臓器灌流液注、直腸投与等であり、例えば注射剤としての製剤化する場合の担体とし

ては、滅菌水、塩溶液、グルコース溶液、または塩水とグルコース溶液の混合物等を使用することができる。また緩衝剤 pH 調節剤（リン酸水素ナトリウム、クエン酸等）、等張化剤（塩化ナトリウム、グルコース等）、保存剤（パラオキシ安息香酸メチル、p-ヒドロキシ安息香酸プロピル等）等の製薬補助剤を含有することもできる。

- 5 このように製剤化した薬剤は、細菌保持フィルターを通す濾過、組成物への殺菌剤の混入、組成物の照射や加熱によって滅菌することができる。また粉末状態で製剤化し、使用時に前記液体担体と混合して注射液を調製するようにしてもよい。

- 経口投与剤は胃腸器官による吸収に適した剤形（例えば、錠剤、カプセル剤、顆粒
10 剤、細粒剤、粉末剤、または懸濁剤やシロップ剤のような経口液体調製物等）に製剤化する。担体としては、常用の製薬補助剤、例えば結合剤（シロップ、アラビアゴム、ゼラチン、ソルビット、トラガカント、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシプロピルセルロース等）、賦形剤（ラクトース、シュガー、コーンスターチ、リン酸カルシウム、ソルビット、グリシン等）、滑沢剤（ステアリン酸マグネシウム、タルク、ポリ
15 エチレングリコール、シリカ等）、崩壊剤（ポテトスターチ、カルボキシメチルセルロース等）、湿潤剤（ラウリル硫酸ナトリウム等）を使用することができる。ストロベリー・フレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加することもできる。また錠剤は常法によりコーティングすることができる。経口液剤は水溶液またはドライプロダクトにすることができる。そのような経口液剤は常用の添加剤、例えば保存剤
20 （p-ヒドロキシ安息香酸メチルもしくはプロピル、ソルビン酸等）を包含していてもよい。

ACE の含有量は対象疾患やその投与形態に応じて適宜とすることができるが、通常は 5～100%(w/w)、好ましくは 10～60%(w/w)の範囲とすることができる。

25

この発明の薬剤の投与量は、患者の年齢や体重、症状、投与経路等によって異なるが、ACE 量として 100～200mg/kg/day 程度とすることができる。なお、ACE は人体に存在するタンパク質であり、その安全性については問題がない。

30

実施例

以下、実施例として ACE 活性について試験した結果を記載し、この発明についてさらに詳細かつ具体的に説明するが、この発明は以下の例によって限定されるものではない。

1.材料と方法

1.1.組織学的分析

10 GPI アンカー-GFP (EGFP-GPI) 遺伝子導入マウス (Kondoh, G. et al. FEBS lett. 458, 299-303, 1999) をフェノバルビタールにより麻酔し、左心室経路で 4%(W/V)パラホルムアルデヒド-PBS を灌流させることにより固定した。切除した組織を 4%パラホルムアルデヒド-PBS 中で再度固定し、20%スクロース-PBS 中で 4℃
15 で 48 時間にわたりインキュベートした。次に組織断片を Tissue-Tek O.C.T 化合物 (Sakura Finetek, Torrance, CA) 中に埋め込み、ドライアイスで急速冷凍し、低温槽上で 5-10 μ m 厚に切断した。標本の調査は、GFP 特異的フィルタを用いた蛍光顕微鏡 (Olympus, Tokyo) を用いて行った。

1.2.破碎細胞サンプルの調製

20 Complete TM プロテアーゼ阻害剤 (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) 存在下、氷冷状態の TNE 溶液 (10mM Tris-HCl pH7.8, 1mM EDTA, 150mM NaCl) 中で細胞と組織を超音波破碎に続いてポリトロンホモジナイザーでホモジナイズした。ホモジネートは 100,000 \times g で遠心分離し、上清を収集した (水溶性分画)。沈殿は TNE 緩衝液中で洗浄し、次に 1% TritonX-114 (Nacalai
25 tasque, Kyoto, Japan) -TNE 溶液中、Complete TM プロテアーゼ阻害剤の存在下でホモジナイズを行い、100,000 \times g で遠心分離し、上清を収集した (界面活性剤可溶性分画)。精子サンプルは破碎前に TYH 培地に 1 時間おいて受精能獲得処理を行った。

30 1.3.イムノプロット

各組織の両方の分画を非還元状態で SDS-PAGE に供し、ニトロセルロース膜に電気泳動的に転写し、抗 GFP (MBL, Nagoya, Japan)、PLAP(Biomedica)、抗 TEPS5、および抗 PH-20 それぞれのウサギポリクローナル抗体、および抗ファーンイリンβマウスモノクローナル抗体によるプローブ処理を行い、ECL システム (Amersham Bioscience, Pistataway, USA) を用いて染色の検出を行った。

1.4.PLAP 変換アッセイ

非イオン化界面活性剤の TritonX-114 が、37℃の条件で水溶性分子と界面活性剤可溶性の疎水性分子を分配する性質を利用した。PLAP 変換アッセイを用いて、精製途中における GPI アンカータンパク質遊離活性のモニタリングを行った。PLAP は、COS7 細胞中で cDNA を発現させて緩衝液 (20mM Tris pH8.0、150mM NaCl、1% TritonX-114、Complete TM プロテアーゼ阻害剤) により抽出することにより調製し、37℃で分配した後で界面活性剤可溶性の相を収集した。次に DEAE-セルロース陰イオン交換液体クロマトグラフィー (LC) (溶出バッファー: 20mM Tris pH8.0、0.1% TritonX-100、0mM~500mM NaCl 勾配)、抗-PLAP 抗体カラム (抗体: ウサギポリクローナル抗-PLAP 抗体 (Biomedica) ; カラム: Hitrap NHS-Activated HP (Amersham Bioscience) ; 溶出バッファー: 100mM グリシン pH2.8) で PLAP を精製した。界面活性剤可溶性の PLAP タンパク質を基質に用いてアッセイを行った。PLAP 活性の測定は、アルカリホスファターゼ検出キット (Nacalai tasque, Kyoto) を用いて製造元のプロトコルに従って行った。変換反応は、100mM Tris pH7.5、5mM CaCl₂、150mM NaCl および 0.1U の PLAP の条件で、90 分にわたり 37℃で実施した。反応停止は TritonX-114 を最終濃度 2%となるように添加することで行い、試料を 25℃で微小遠心分離した。水溶相を収集し、PLAP 活性を測定した。またこれはポリクローナル抗-PLAP 抗体を用いたイムノブロットティングにも用いた (Biomedica, Foster City, USA) 。

1.5.GPI アンカータンパク質遊離活性物質の精製

成熟した ICR マウスの精巣 500 個を莢から出し、カミソリを用いて~1mm³の断片に切断した。生殖細胞の単離はピペット吸引の反復により行った。軽い遠心により輸精管を除去した後、上清を収集し、1500×g で遠心分離することによりさらに沈

降させた。沈殿は 10 倍量の緩衝液 (3mM Tris pH7.4、2mM MgCl₂、1mM EDTA、0.25M スクロース、および Complete TM プロテアーゼ阻害剤を含む) 中で破碎および超音波処理を行い、ホモジネートを 100,000×g で 1 時間にわたり遠心分離した。その沈殿を 10 倍量の緩衝液 (20mM Tris pH8.0、1% TritonX-100、および
5 Complete TM プロテアーゼ阻害剤を含む) 中で可溶化した。溶解産物は超遠心 (100,000×g) で 1 時間にわたり分離を行い、上清を収集した。この試料を以下の連続液体クロマトグラフィーにより精製した。

- (1) DEAE-セルロース (Seikagakukogyo, Tokyo) ; 緩衝液 (20mM Tris pH8.0、0.1% TritonX-100、0mM~500mM NaCl 勾配) で溶出。
- 10 (2) フェニルセファロース X CL-4B (Amersham Bioscience, Piscataway, USA) : 緩衝液 (20mM Tris pH7.5、0.1% TritonX-100) で溶出。
- (3) ConA-セファロース 4B (Amersham Bioscience, Piscataway, USA) ; 緩衝液 (20mM Tris pH7.5、0.1% TritonX-100、150mM NaCl、500mM methyl- α -D-mannnopyranosid (Seikagakukogyo, Tokyo)) で溶出。
- 15 (4) TSK ゲル 3000SW (Tosoh, Tokyo) ; 緩衝液 (20mM Tris pH7.5、0.1% TritonX-100、300mM NaCl) で溶出。

1.6. プロテオミクス分析

精製ペプチドを SDS-PAGE により分離し、ゲル中でトリプシンまたは 0.1M 臭化
20 シアンを含む 70%ホルマリン溶液で消化し、キャピラリーHPLC (Magic) およびイオン捕集マスマススペクトル分析 (ThermoFinnigan) に供した。それぞれの得られたシグナルに対して Sequest および Mascot 検索を行った。S マスマススペクトルで識別されたペプチドはトリプシン消化逆相 HPLC で分離後、ある程度の量を供出してオートマチックペプチドシーケンサーで同定した。

25

1.7. 細胞培養とトランスフェクション

F9、HeLa および COS7 細胞を、10% FCS を加えた DMEM 培地中で培養した。DNA トランスフェクションにはリポフェクトアミン試薬 (Life Technologies, Rockville, USA) を製造元のプロトコルに従って使用した。

30

1.7.ACE 試料

ACE cDNA を、マウス精巣 cDNA をテンプレートとして、

'5-tgaattccacccatgggccaaggttgggctactccagg-'3 (配列番号 1) および

'5-gaattcgtcacttatcatcatcatccttataaatcctgctgtggctccagggtacaggc-'3 (配列番号 2)

- 5 のプライマーセットを用いて RT-PCR により調製した。この PCR 産物は、FLAG を付加した可溶性精巣 ACE のアイソフォームをコードしている。グルタミン酸 414 をアスパラギン酸へアミノ酸置換によりペプチダーゼ活性を不活性化した変異タンパク質の cDNA は、変異導入プライマーとして、

'5-cttggtgatagcgcaccacgatatgggccacatccagtatttcatgca-'3 (配列番号 3) を用いた

- 10 部位特異的変異誘発により合成した。cDNA の発現には CAAG ベクターを利用した。この ACE cDNA をトランスフェクションした COS7 細胞の培養上清を収集し、組換え ACE を抗-FLAG M2-アガロースアフィニティカラム (Sigma, St. Louis) を用いて精製した。また、ウサギ肺由来 ACE の体細胞アイソフォーム (ACE-S) (Sigma A-6778) を、製造業者の支持する活性単位で使用した。ACE のペプチダーゼ活性は
15 公知の方法 (Kasahara and Ashihara, Clin Chem. 27:1922-1925, 1981) で行った。

1.9.FACS 分析

- 0.02% EDTA/PBS を用いて細胞を培養皿から剥離させ、1% BSA を含む
20 Hank' s 調整塩溶液に数回浸した。懸濁した細胞を、適切な時点で 10 μ g/ml のフィリピン (filipin) /PBS (Sigma, St. Louis) を用いて 0℃ で 1 時間にわたり処理した。PBS に浸した後、細胞を ACE または 1.0IU/ml PI-PLC (GLYKO, Novato, USA) または PBS のみで、カプトプリル (Sigma, St. Louis) の存在下または非存在下の条件で、37℃ で 1 時間にわたり処理を行った。次に細胞を 1% BSA を含む
25 PBS に繰り返し浸し、ヒト CD59、ヒト DAF、マウス Sca-1 (Pharmingen-Fujisawa, Tokyo)、マウス Thy1.2 (Pharmingen-Fujisawa, Tokyo)、マウス E-カドヘリン (宝酒造)、ヒトプリオンタンパク質 (3F4, Signet Laboratories) に対するビオチン共役抗体を用いて染色し、次にフィコエリトリン共役ストレプトアビジン (Pharmingen-Fujisawa, Tokyo) を用いて染色した。

- 30 また、プリオンタンパク質 (PrP) の遊離活性は、ヒト胎児由来線維芽細胞

(HEK293 細胞) および抗ヒトプリオンモノクローナル抗体 3F4 (Signet Laboratories, USA) を使用し、前記と同様に染色した。

染色した細胞を FACScan セルソーターに供した。ソートされた細胞の生存度を、FSC および SSC チャンネルにより評価した。F9 細胞内で発現した EGFP-GPI は直接検出した。切断の定量はそれぞれの細胞における平均の蛍光発光強度より次式によって切断放出 (%) を算出した。

$$\text{切断放出 (\%)} = (\text{ACE(-)} - \text{ACE(+)}) / (\text{ACE(-)} - \text{PI-PLC})$$

すなわち、PI-PLC 処理時の蛍光強度を最大値、ACE(-)での蛍光強度を切断がないものとした。

10

1.10.放射性標識分析

EGFP-GPI を発現する F9 細胞を 0.2mCi/ml の [³²P]-オルトリン酸 (Amersham Bioscience) もしくは 0.1mCi/ml の [³H]-エタノールアミン (Amersham Bioscience) で 16 時間処理し代謝による標識を行った。フィリピン処理を行った細胞を、0.5 μM ACE、1.0IU/mlPI-PLC、マウス腺性カリクレイン (mGK: EGFP を C 末端近傍で切断する酵素) を含む顎下腺の 10%ライセートのいずれかで 1 時間 37℃で処理した。遊離した EGFP を抗 GFP 抗体で免疫沈降させ、SDS-PAGE を行い、ニトロセルロース膜に転写した。EGFP-GPI タンパク質の量は、デンシトメトリ (Molecular Device) での EGFP イムノプロットで検出された EGFP-GPI のバンド強度の測定、および同じバンドについて液体シンチレーションカウンタでの放射能測定により行った。

20

1.11.精子-卵結合能測定

全ての生殖細胞 TYH 培地中で取扱いおよび静置をおこなった。同腹の正常マウス および ACE 欠損マウスから精巣上体を摘出し、250 μl の培地を加え刻んだ。精子を 15 分間泳がせた後に、1.5ml 培地に移し変え、すくなくとも 1 時間以上培養した。卵細胞は過排卵された C57BL/6 マウスの卵管から採取し、THY 培地で積層細胞を除去するために 1mg/ml のヒアルロニダーゼ (Sigma) で処理した。培養した精子 (約 2.0×10⁶ 個/ml) 次の試薬で 90 分、それぞれ処理した。野生型 ACE(ACE-WT)0.2U/ml、ACE-E414D 0.2U/ml、PI-PLC 1.0IU/ml、4mM イノシトールモ

30

ノリン酸 (Sigma) をふくむ PI-PLC 1.0ml、4mM イノシトールモノリン酸のみ、
または PBS バッファーのみ。生殖細胞はミネラルオイルで表面を覆った TYH 培地
中で 1 時間インキュベートし、PBS で穏やかに 4% 洗浄後、パラホルムアルデヒド
を含む PBS で固定し、卵-精子結合能測定に供した。卵細胞は 200 倍の光学顕微鏡
5 (オリンパス) で観察し、卵子に集合してきた精子の数は、卵子の直径がもっとも大
きく見える焦点にあわせてカウントした。

2. 結果と考察

10 2.1. 遺伝子導入マウスとその GPI タンパク質

図 1 は、EGFP-GPI 遺伝子導入マウスの精巣の蛍光シグナルを撮影した写真像で
ある。生殖細胞 (Gc) における EGFP-GPI の発現は第 2 系統 (Line 2) に見られた
が、第 1 および第 3 系統には見られなかった。

図 2 は、遺伝子導入動物の精巣における EGFP-GPI タンパク質の溶解度を解析し
15 た結果である。界面活性剤を添加した溶解緩衝液 (Tx-114+) または界面活性剤非
添加の溶解緩衝液 (Tx-114-) を用いて組織を可溶化し、溶解産物の一部をウエスタ
ンブロットイングに供した。EGFP-GPI が界面活性剤非存在下で積極的に可溶化し
たのは、第 2 系統の精巣においてのみであった。水溶性タンパク質の大きさ (Ln.2,
Tx-114-) が界面活性剤可溶性の膜アンカータンパク質 (Ln.2, Tx-114+) と同等で
20 あった点は特記すべきである。

2.2. GPI アンカータンパク質放出因子の特定

EGFP-GPI 遺伝子導入マウスを用いて、GPI アンカー膜結合型タンパク質放出因
子の同定を行い、目的の活性を有する 100kDa タンパク質を精製した。すなわち、
25 マウス精巣に由来する生殖細胞の膜リッチ分画を 1% Triton X-100 を含む緩衝液中
で可溶化し、遠心分離を行って上清を取り、連続液体クロマトグラフィーによる分画
に供した。溶出分画に対して PLAP 変換アッセイを行い、その最大値を表 1 に示す。
なお、全ての反応は PI-PLC (1.0U/ml) 処理を付随して行い、その値を最大反応と
して定義した。図 3 は、銀染色によるこの 100kDa タンパク質の単一バンドを示す。

表 1

カラム	容量 (ml)	全蛋白 (mg)	全活性 (u*)	特異活性 (u/mg 蛋白)	精製倍率
S-100 上清	393	19100	336160	18	1.0
DEAE-セルロース	8	228	14410	63	3.5
フェニルセファロース	8	212	17596 X	83	4.6
ConA-セファロース	1	6	6100	1017	56.5
TSK ゲル 3000SW	1	1	2500	2500	138.9

*U(unit X)=サンプル値-バックグラウンド値/PI-PLC 値-バックグラウンド値

この精製タンパク質は、プロテオミクス分析により ACE であることを確認した。

5 さらにこの精製タンパク質活性を、組換え ACE および市販品 ACE と比較した。

すなわち、組換えタンパク質および市販品 ACE は PLAP を水溶性形態に変換するかを確かめるため、部分精製した PLAP を、精製組換え ACE (ACE-T) または市販製品 (ACE-S) と反応させた。TritonX-114 による分配後、水溶性相の一部を SDS-PAGE に供し、PLAP を免疫ブロッティングにより検出した。結果は図 4 に示した通りである。可溶性 PLAP に相当するバンドは PI-PLC 処理を行った試料よりわずかに小さいが、ACE-T および ACE-S 処理サンプルの両方に見ることができる。

また、ACE 反応の用量依存性を。部分精製した PLAP を様々な濃度の ACE-S と反応させ、水溶相の PLAP 活性を測定した。結果は図 5 に示したとおりである。この図 5 に示したとおり、市販品 ACE においてもその活性は用量依存的であり、しかもこの活性は特異的な ACE 阻害剤であるカプトプリルによって阻害された。

ACE の GPI アンカー型タンパク質遊離活性の活性中心について、既知であるペプチダーゼ活性中心の Asp414 を Glu に置換した組換え体 ACE (E414D) を作成し、GPI アンカー型タンパク質遊離活性およびペプチダーゼ活性について測定を行った (図 6、図 7)。その結果、ペプチダーゼ活性は 1/1000 以下に下がったの対して、GPI アンカー型タンパク質遊離活性は野生型とほとんど変わらなかった。このことより ACE の GPI アンカー型タンパク質遊離活性を担当する活性中心は、ペプチダーゼ活性を示す部位とは別の場所に局在することが示唆された。

2.3.GPI アンカー型タンパク質に対する ACE の作用

GPI アンカータンパク質に対する ACE の活性を精査するため、EGFP-GPI を細胞表面で安定に発現する F9 細胞を使用し解析を行った。フィリピン前処理済みのおよび未処理の EGFP-GPI 発現 F9 細胞を 1.0U/ml の ACE-S または 2.8U/ml の PI-PLC により処理し、EGFP-GPI の動態を GFP 蛍光の観察により、また EGFP-GPI、Sca-1、Thy-1 および E-カドヘリンの細胞表面発現を FACS 分析によりそれぞれ解析した。ACE は EGFP-GPI の発現にほとんど影響しないが、フィリピン処理を行った細胞については、ACE 処理により細胞表面から EGFP-GPI のほとんど全てを遊離させた（図 8、9）。実際、GPI アンカー型タンパク質は細胞膜の脂質ラフトに局在化して包含されており、外来性の ACE は脂質ラフトにより基質分子への会合が阻害されているように思われる。他の GPI アンカー型タンパク質、Sca-1、Thy-1 も細胞の ACE 処理によって同様に切断放出されることが確認された。これより、ACE および PI-PLC は、膜貫通型タンパク質である E-カドヘリンには何ら作用を及ぼさないといっばうで、GPI アンカー型タンパク質に特異的に切断酵素活性を示すことが確認された。

さらに、HeLa 細胞上で CD59 および解離促進因子（DAF）の 2 種類の GPI アンカー型タンパク質を、HEK293 細胞でプリオンタンパク質をそれぞれ分析対象とし、ACE による切断活性を同様な FACS 分析により調査した（図 10、11）。その結果、これら GPI アンカー型タンパク質がいずれも細胞膜上から切断放出されたことが確認された。さらに、HeLa 細胞での CD59 の ACE の切断活性は、コレステロールブロッッキング剤であるフィリピン（filipin）を用いて膜脂質ラフトを崩壊させた場合により明確化し（図 10）、ACE 用量依存的であり（図 11）、またカプトプリルによる阻害された（図 12）。F9 細胞の事例とは対照的に、ACE はヒト細胞上で ACE は、フィリピン処理を行わずとも容易に細胞表面から GPI アンカー型タンパク質を遊離させることが確認された（図 14）。

2.4.ACE の GPI アンカー型タンパク質遊離活性における基質切断部位の同定

GFP-GPI を発現する F9 細胞を PLAP とともに ACE 処理し、抗 GFP 抗体カラムで遊離した EGFP-GPI を精製し、トリプシン、臭化シアンもしくは Staphylococcus aureus V8 プロテアーゼを用いた HPLC-マススペクトル解析で C

末端の構造決定を何度か試みたところ、いずれもターゲットペプチドの捕集に失敗し構造決定が不可能であった。これより、遊離した GFP-GPI は C 末端に GPI アンカーの一部が繋がったままの構造であることが推測された。

そこで、GPI アンカーの特定部位を放射ラベルする [^{32}P]-リン酸、または [^3H]-エタノールアミンを用いて、EGFP-GPI を発現する F9 細胞に代謝ラベルを行い、ACE、PI-PLC、mGK でそれぞれ処理したのちに遊離したタンパク質を、EGFP イムノプロットにより検出し、検出されたバンドについてそれぞれの放射線強度を測定した (図 15)。分析は少なくとも 4 回行い、ほぼ同一の結果が得られた。mGK 処理では ^{32}P または ^3H で放射ラベルされた遊離 EGFP-GPI はどちらも検出されなかったが、ACE 処理および PI-PLC 処理ではどちらの放射ラベルも検出された。これより ACE 処理産物には GPI アンカー型タンパク質の構造の一部でも存在していることが示された。また、ACE 処理で遊離したタンパク質の放射線強度は、PI-PLC 処理の場合と比較してリン酸ラベルの場合で約 1/3、エタノールアミンラベルの場合で約 1/2 の検出強度だった。図 16 に示したように、GPI アンカー上ではラベルに用いた放射性同位元素は局在化しており、先の検出強度の差分より ACE の切断部位は既知の PI-PLC の切断部位より GPI アンカー型タンパク質に近く、GPI アンカー骨格のアンカー型タンパク質が付加する末端に 3 つ連なっているマンノース付近であることが示唆された。

2.5. 卵結合能を欠失した精子への ACE の作用の解析

ACE ノックアウトマウスでは雄性不妊が認められる。ACE ノックアウトマウスの精子は正常の精子と比較して、透明体 (zona pellucida) における精子-卵結合能が欠失していることが、XKrege et al., Nature 375:146-148,1995 で、報告されている。

受精時に精子から遊離される事が知られている GPI タンパク質、TESP5 と PH-20 (非特許文献 3 および 4) を対象として、正常マウスおよび ACE ノックアウトマウス精巣上体由来の精子について、それぞれ水溶性成分 (WS) および界面活性剤可溶性画分 (DS) に分配し、イムノプロットで分析した (図 17)。精子から遊離した水タンパク質は可溶性画分に分配されるが、正常な精子の水溶性画分 (WS) からは TESP5 と PH-20 の両タンパク質が検出され、ACE ノックアウトマウスの精子では水溶性画分か

らはどちらも検出されなかった。この結果から、ACE は GPI アンカー型タンパク質の放出に必須である可能性が示された。

さらに精子-卵結合における ACE の影響の同定を試みた。前記の正常マウス、および ACE ノックアウトマウス、それぞれの精巣上体由来の精子を、野生型 ACE、ペプチダーゼ活性欠損 ACE (E414D)、PI-PLC でそれぞれ処理し、C57BL/6 マウスの未受精卵に接種した。正常マウスの精子ではこの処理により受精能に何ら影響が見られなかったが、対照的に卵結合能を欠く ACE ノックアウトマウスの精子では、野生型 ACE、ペプチダーゼ活性欠損 ACE のどちらの ACE 処理においても、精子結合能が大きく回復した (図 18、図 19)。さらに、PI-PLC 処理の場合においても、X
10 PI-PLC に特異的な阻害剤イノシトールモノリン酸 (inositol-P) で (PI-PLC 処理を) 阻害した場合を比較することによって、ACE ノックアウト精子の卵結合能が回復することが明らかとなった。以上より、ACE のもつ GPIase 活性が、受精時における精子の卵結合能に決定的な形で関与していることが結論付けられた。

15 2.6.ACE の GPIase 活性の特徴と利用

GPI アンカー切断活性 (GPIase 活性) を示すタンパク質としては、哺乳類においては、唯一 GPI-PLD が知られている。しかし、GPI-PLD は細胞内で GPI-PLD を発現する場合に限って、GPIase 活性を示すことが、培養細胞を用いた研究により報告されている (Tujioka et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 251:737-747,
20 1998)。すなわち GPIase 活性の医薬への利用という観点から、外来性の GPI-PLD は有効に作用した事例がない。一方で、ACE はヒトの培養細胞や組織に添加するだけで、細胞膜の構造を薬剤処理等で破壊することなく、容易に GPI アンカー型タンパク質を能率的に遊離することができるという優れた特性をもつ。

ACE の GPIase 活性の優れたもうひとつの特性は、その GPI アンカー切断部位で
25 ある。図 16 の模式図に示した GPI アンカーの構造における切断部位は、成熟 GPI アンカーにおいては、イノシトールのヒドロキシル基への脂肪酸付加 (アシル化) がよく起こる。GPI-PLD の切断部位はイノシトールの直近であるため (図 16 および Hagaman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 95:2552-2557, 1998) X切断できない。実際、アシル化が顕著な健全赤血球では、GPI-PLD によって解離促進因子
30 (DAF) の切断ができない (Davitz et al., *J. Biol. Chem.*, 264: 13760-13764,

1989)。一方、ACE は GPI-PLD とは対照的に GPI アンカーのアンカー型タンパク質結合末端側を切断するため、HeLa 細胞において DAF の遊離させたことからイノシトールへの脂肪鎖付加による阻害を受けにくいことは明らかである。

さらに、GPIase 活性を示すタンパク質としてはバクテリア由来の PI-PLC が知ら
5 れているが、GPIase 活性をヒトに対する薬剤として使用する場合に、ACE はヒト体内に通常広く分布していることから、きわめて安全性が高いと考えられる。

また ACE は血圧制御因子として働き、血圧上昇を引き起こす。そのため ACE を阻害する薬理作用を持つ医薬品（血圧降下剤）やペプチダーゼ活性の阻害についての研究がすすめられてきた。ウサギ体細胞由来 ACE（ACE-S）およびマウス精巣由来
10 ACE（ACE-T）の変異型 ACE（E414D）の試験結果は、ACE の副作用を制圧して、目的とする活性のみを利用することが可能であることを明確に示した。

産業上の利用可能性

15

以上詳しく説明したとおり、この出願の発明によって、GPI アンカー型タンパク質を細胞膜から遊離させることによって、プリオン性疾患、炎症性疾患、細菌感染性疾患、精子の卵結合能不足による雄性不妊症等を効果的に予防または治療することのできる薬剤が提供される。

20

請求の範囲

1. アンギオテンシン変換酵素を含有し、GPI アンカー型タンパク質を細胞膜から遊離させることを作用機序とするアンギオテンシン変換酵素含有薬剤。

5

2. プリオン性疾患の予防または治療用である請求項 1 の薬剤。

3. 細菌感染疾患の予防または治療用である請求項 1 の薬剤。

10

4. 精子異常による不妊症の予防または治療用である請求項 1 の薬剤。

5. アンギオテンシン変換酵素が、GPI アンカー型タンパク質遊離活性を保持させたまま、アンギオテンシン変換酵素活性を失活させるアミノ酸変異を導入した変異型アンギオテンシン変換酵素である請求項 1 から 4 のいずれかの薬剤。

15

6. 変異型アンギオテンシン変換酵素が、そのアミノ酸配列中の His Glu Met Gly His 配列におけるいずれか 1 以上のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換した変異酵素である請求項 5 の薬剤。

20

7. 変異型アンギオテンシン変換酵素が、そのアミノ酸配列中の His Glu Met Gly His 配列における Glu を Asp に置換した変異酵素である請求項 6 の薬剤。

8. ペプチダーゼ活性を失活させるアミノ酸変異を導入した変異型アンギオテンシン変換酵素。

25

9. そのアミノ酸配列中の His Glu Met Gly His 配列におけるいずれか 1 以上のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換した請求項 8 の変異型アンギオテンシン変換酵素。

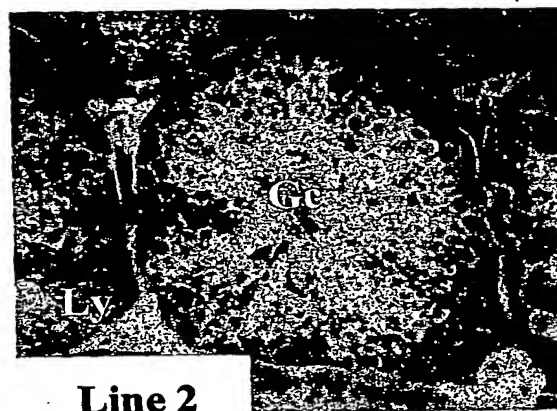
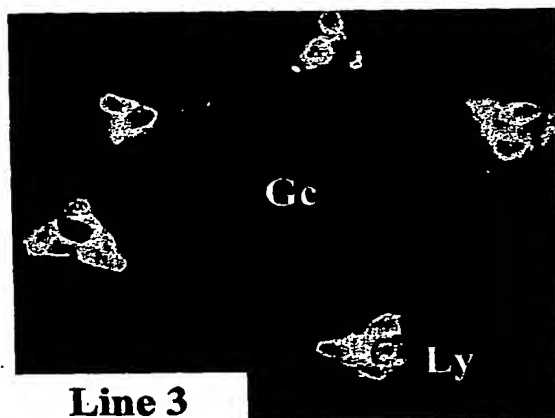
30

10. そのアミノ酸配列中の His Glu Met Gly His 配列における Glu を Asp に置換

した請求項 9 の変異型アンギオテンシン変換酵素。

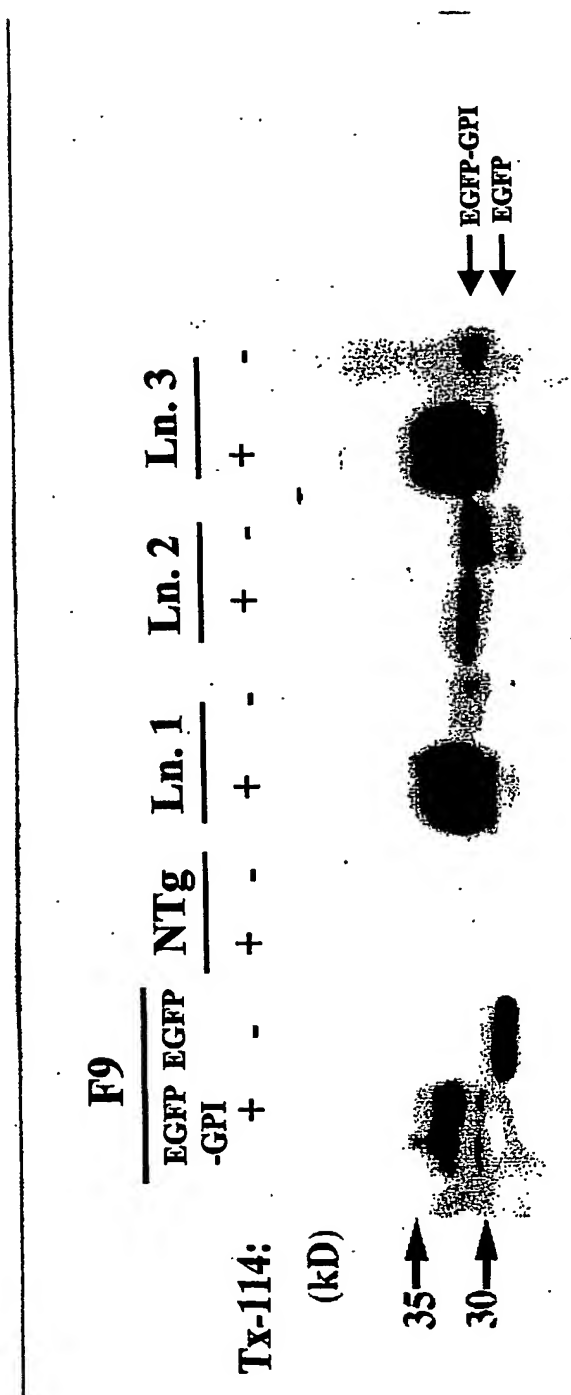
1/12

図 1



1/12/1

図 2



2/12

図 3

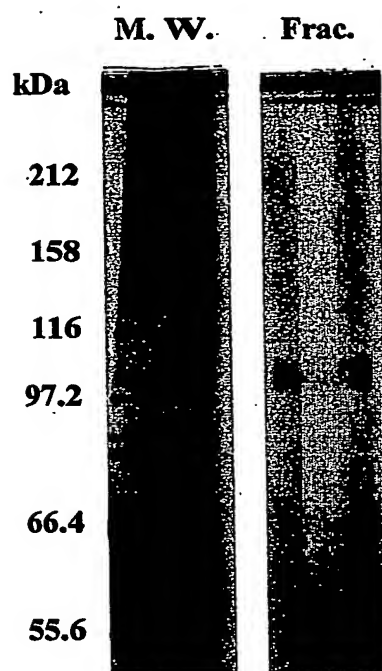
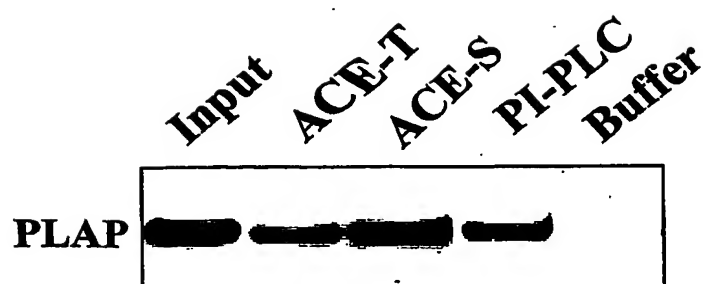


図 4



3/12

図 5

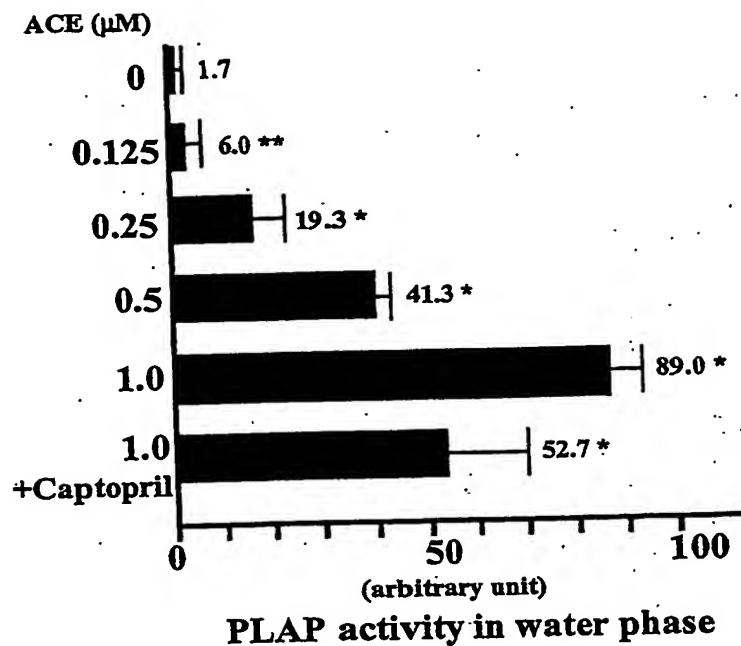
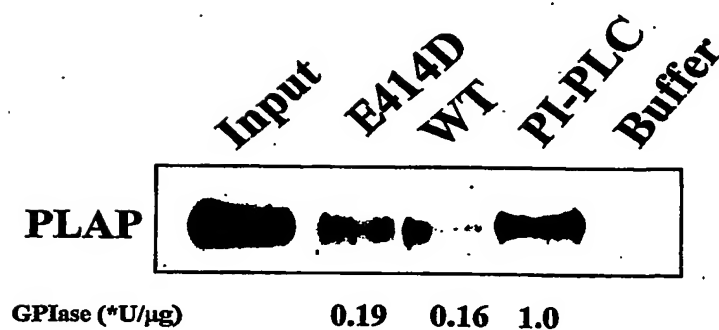
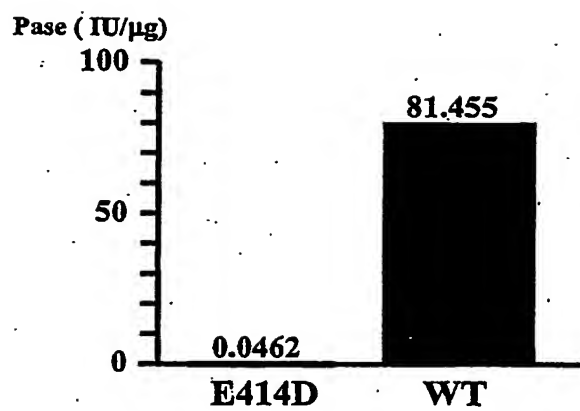


図 6



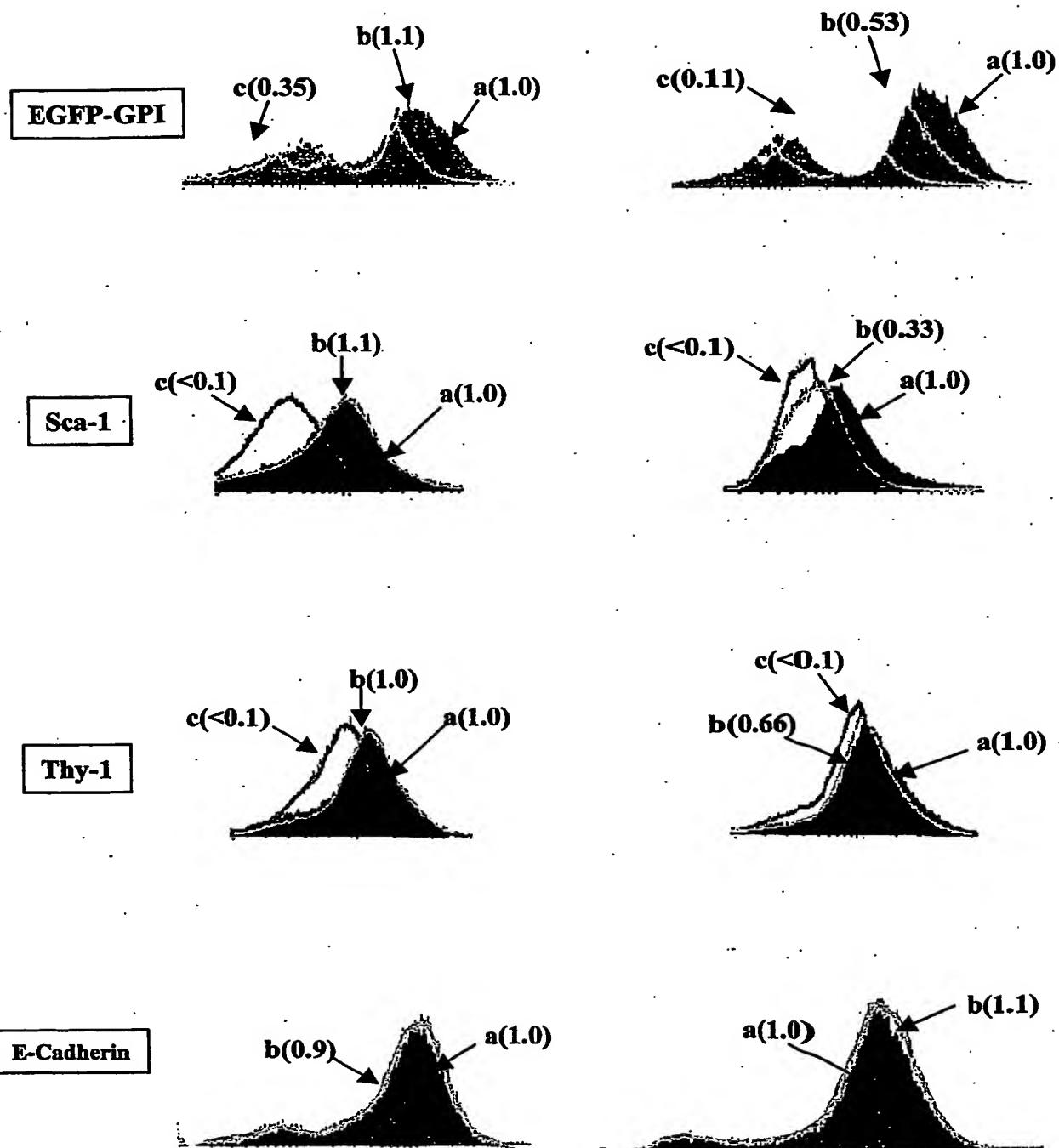
4/12

☒ 7



5/12

図 8



6/12

図 9

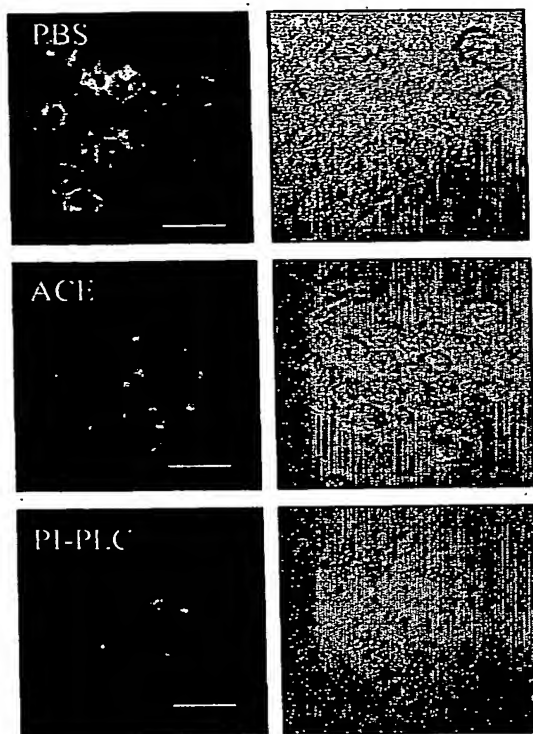
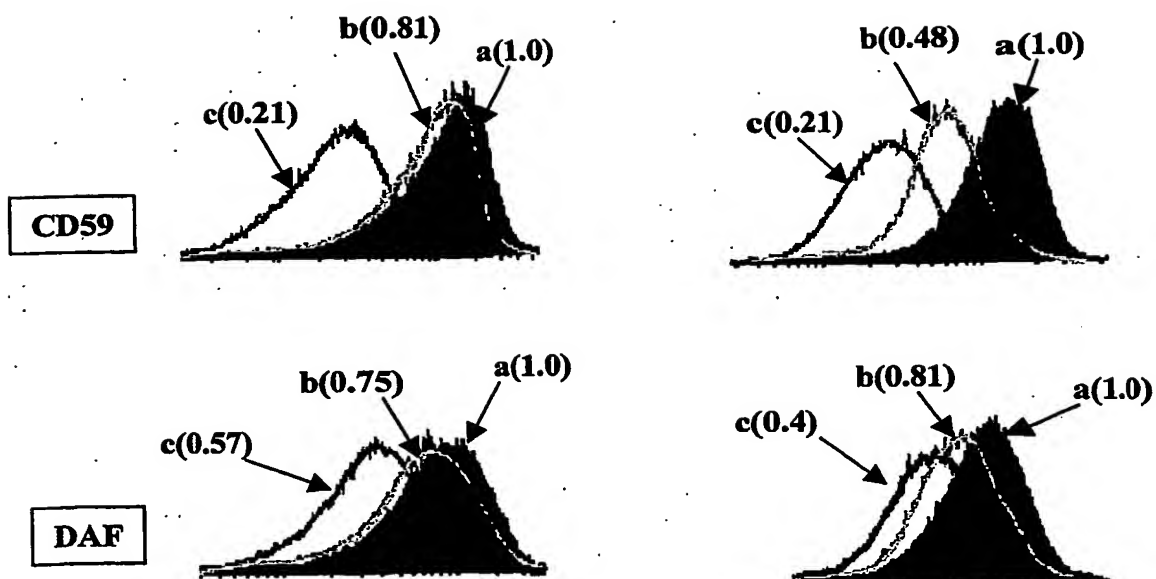
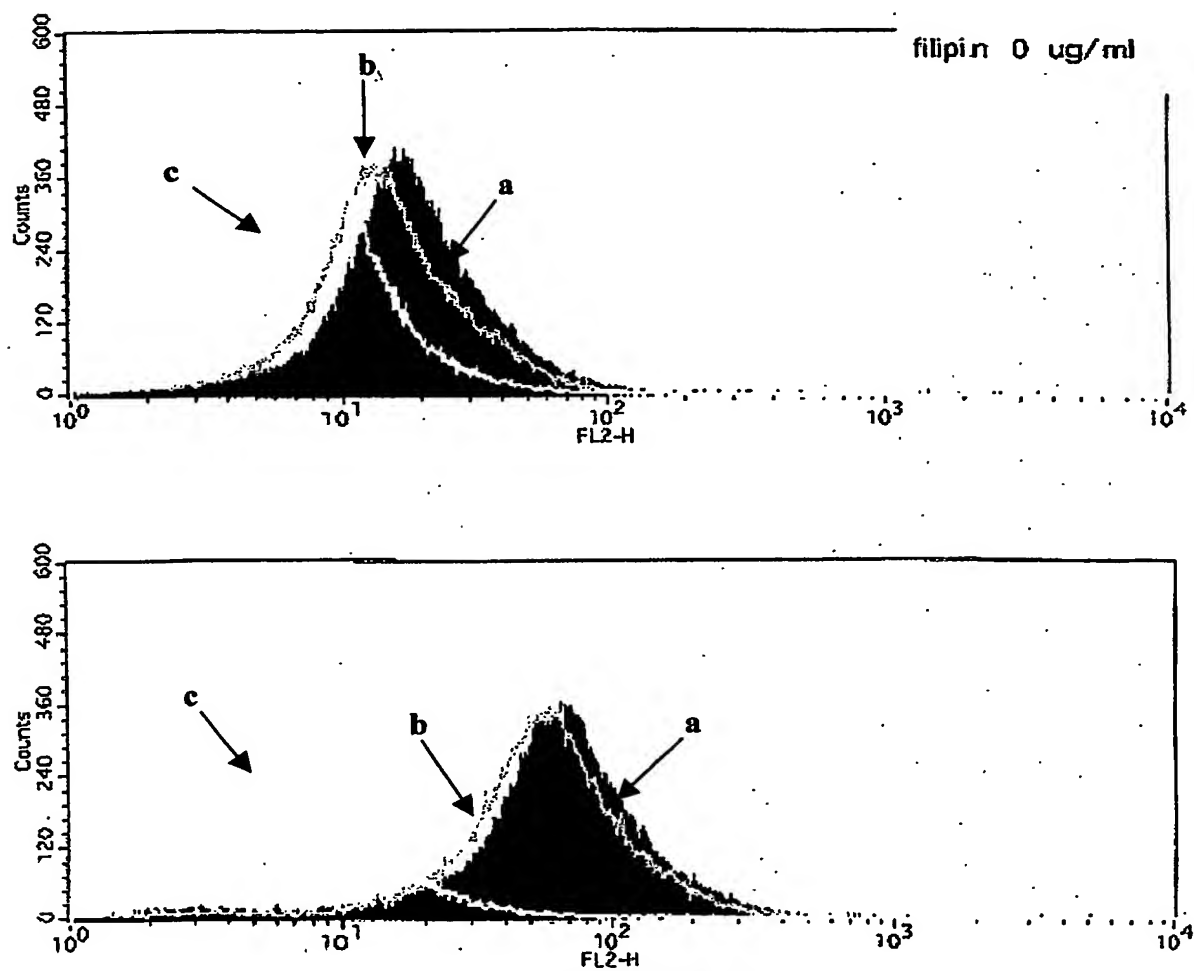


図 10



7/12

図 11



8/12

図 1 2

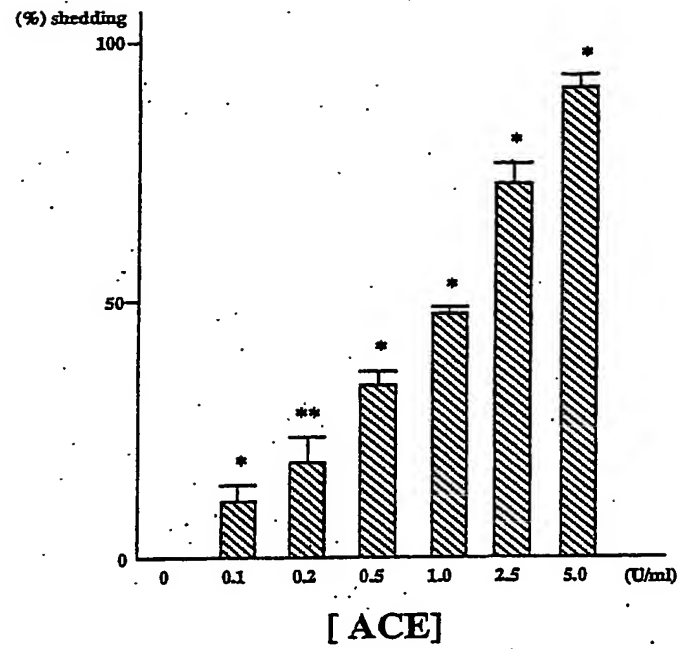
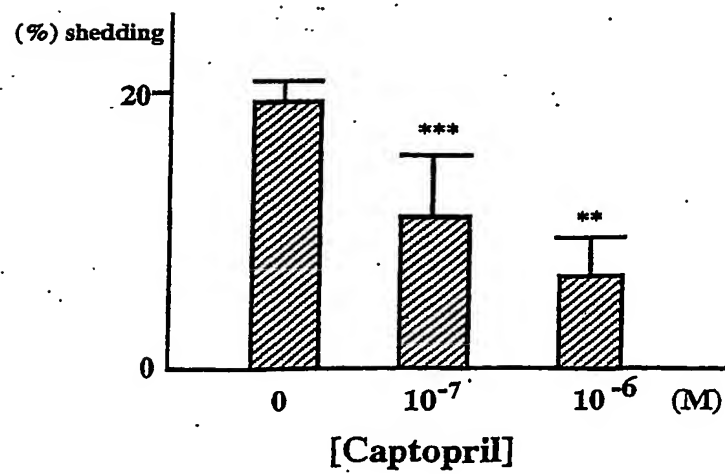
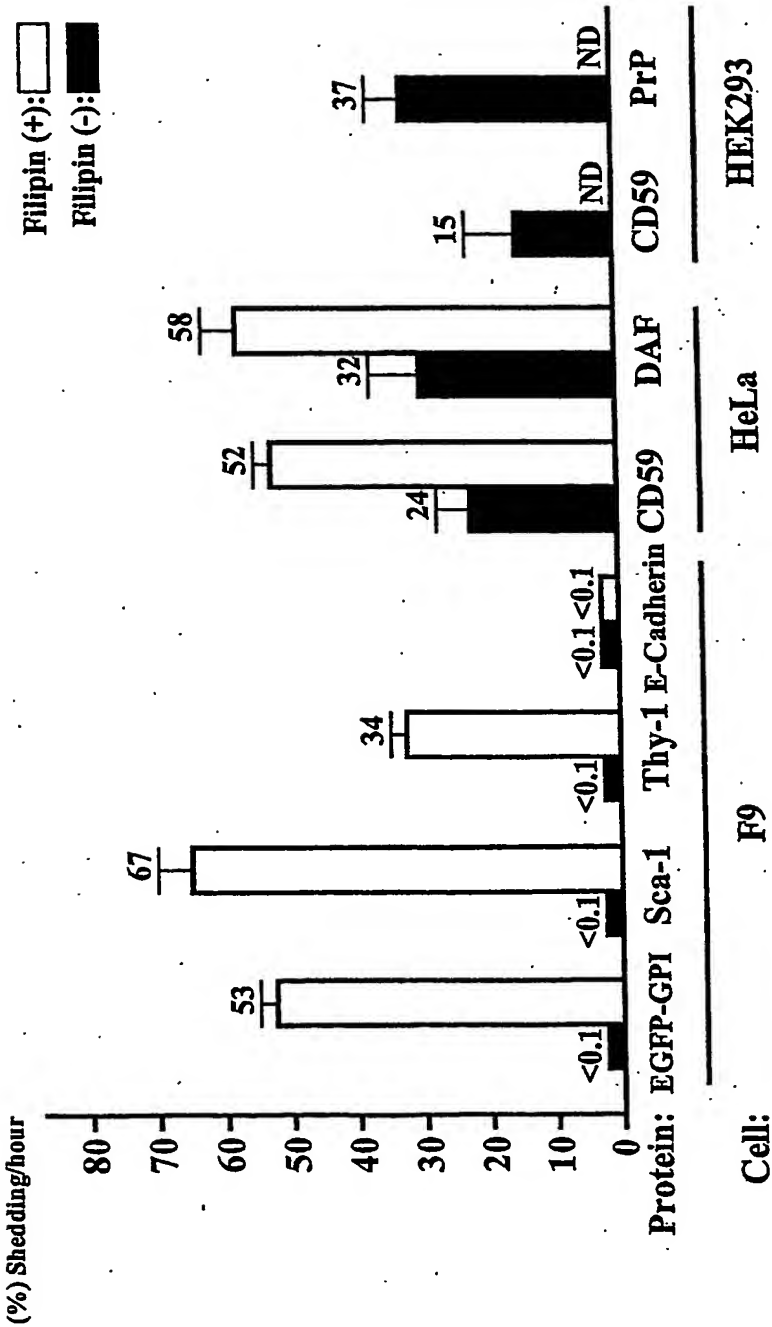


図 1 3



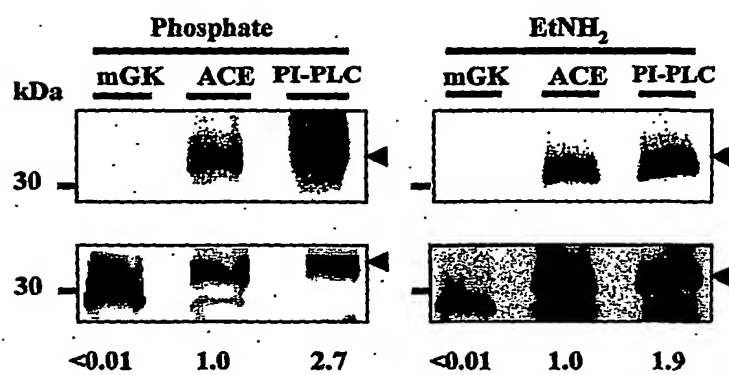
9/12

14



10/12

図 15



11/12

図 16

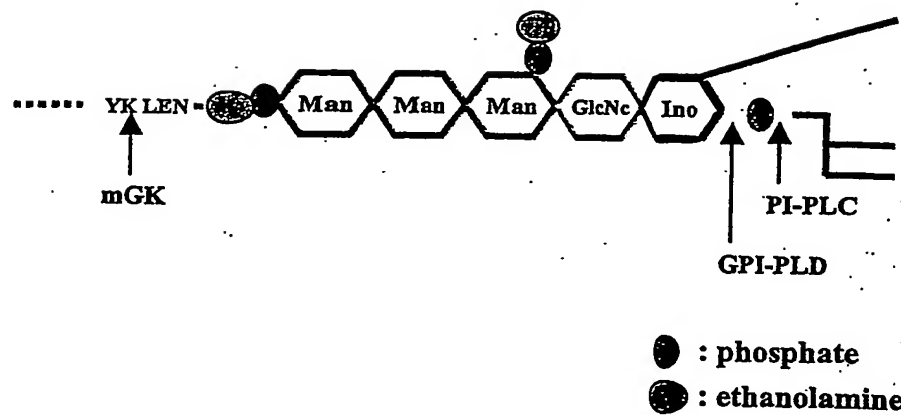
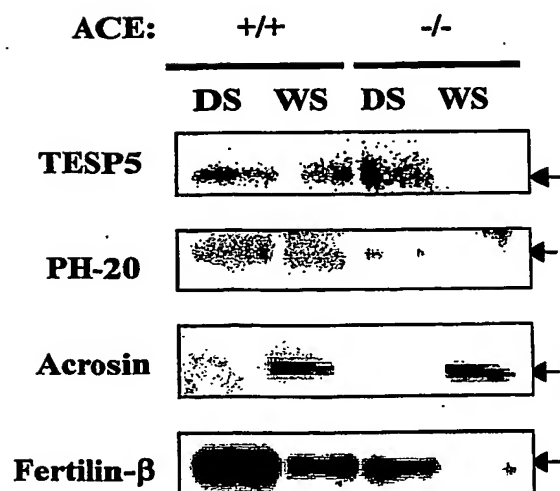


図 17



12/12

図 18

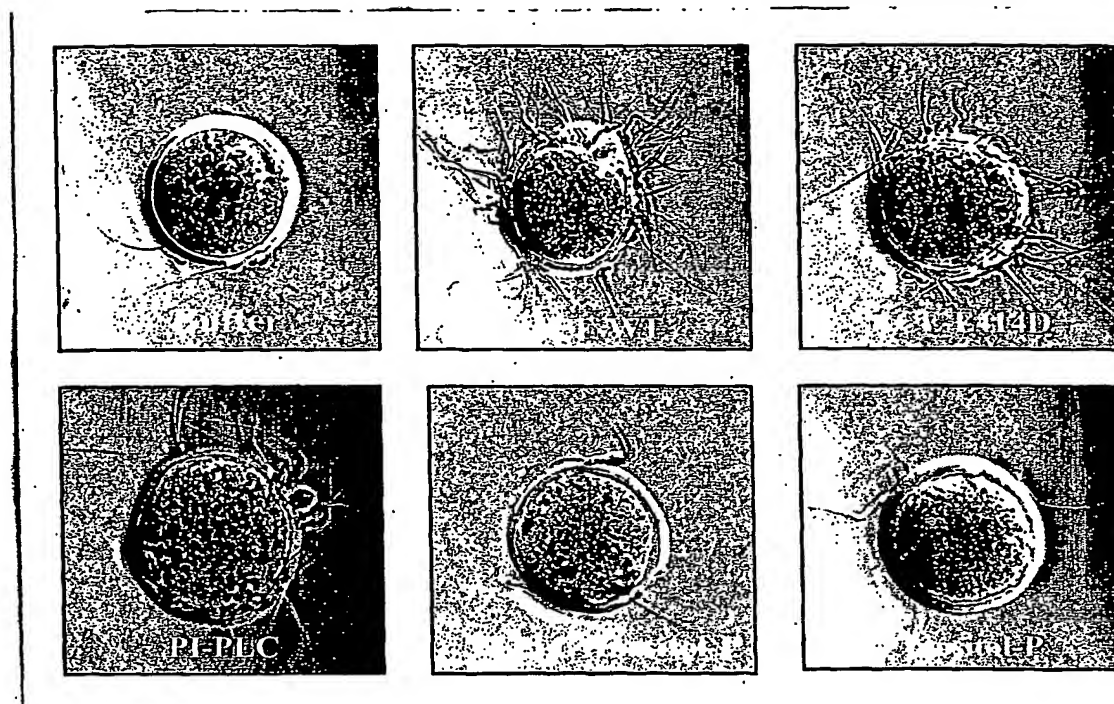
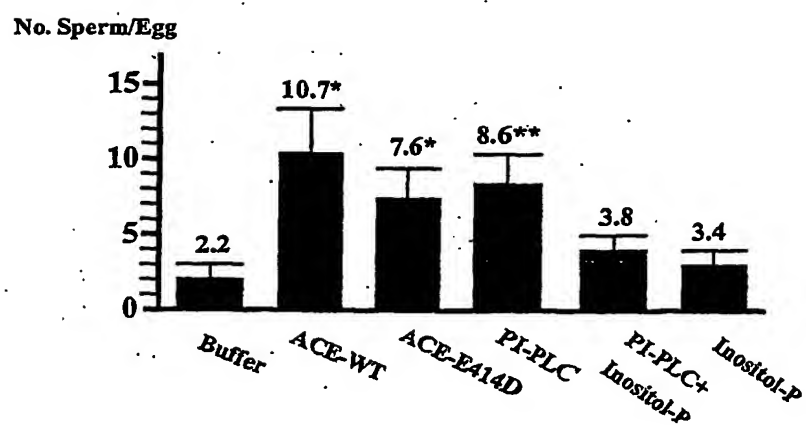


図 19



1/5
SEQUENCE LISTING

<110> Kondoh, Gen

<120> ACE containing drug

<130> 03-F-060PCT

<150> JP 2002-314078

<151> 2002-10-29

<160> 4

<210> 1

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 1

tgaattccac catgggccaagggtgggcta ctccagg 37

<210> 2

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 2

gaattcgtca cttatcatca tcacacctat aatcctgctg tggctccagg tacaggc 57

<210> 3

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 3

cttggatgatag cgcaccacga tatgggccac atccagtatt tcatgca 57

<210> 4

2/5

<211> 764
<212> PRT
<213> Mus musculus

<300>
<308> GenPept/NP_033728
<309> 2003-10-04

<400> 4

Met Gly Gln Gly Trp Ala Thr Pro Gly Leu Pro Ser Phe Leu Phe Leu
1 5 10 15
Leu Leu Cys Cys Gly His His Leu Leu Val Leu Ser Gln Val Ala Thr
20 25 30
Asp His Val Thr Ala Asn Gln Gly Ile Thr Asn Gln Ala Thr Thr Arg
35 40 45
Ser Gln Thr Thr Thr His Gln Ala Thr Ile Asp Gln Thr Thr Gln Ile
50 55 60
Pro Asn Leu Glu Thr Asp Glu Ala Lys Ala Asp Arg Phe Val Glu Glu
65 70 75 80
Tyr Asp Arg Thr Ala Gln Val Leu Leu Asn Glu Tyr Ala Glu Ala Asn
85 90 95
Trp Gln Tyr Asn Thr Asn Ile Thr Ile Glu Gly Ser Lys Ile Leu Leu
100 105 110
Glu Lys Ser Thr Glu Val Ser Asn His Thr Leu Lys Tyr Gly Thr Arg
115 120 125
Ala Lys Thr Phe Asp Val Ser Asn Phe Gln Asn Ser Ser Ile Lys Arg
130 135 140
Ile Ile Lys Lys Leu Gln Asn Leu Asp Arg Ala Val Leu Pro Pro Lys
145 150 155 160
Glu Leu Glu Glu Tyr Asn Gln Ile Leu Leu Asp Met Glu Thr Thr Tyr
165 170 175
Ser Leu Ser Asn Ile Cys Tyr Thr Asn Gly Thr Cys Met Pro Leu Glu
180 185 190
Pro Asp Leu Thr Asn Met Met Ala Thr Ser Arg Lys Tyr Glu Glu Leu

3/5

195	200	205
Leu Trp Ala Trp Lys Ser Trp Arg Asp Lys Val Gly Arg Ala Ile Leu		
210	215	220
Pro Phe Phe Pro Lys Tyr Val Glu Phe Ser Asn Lys Ile Ala Lys Leu		
225	230	235
Asn Gly Tyr Thr Asp Ala Gly Asp Ser Trp Arg Ser Leu Tyr Glu Ser		
	245	250
		255
Asp Asn Leu Glu Gln Asp Leu Glu Lys Leu Tyr Gln Glu Leu Gln Pro		
	260	265
		270
Leu Tyr Leu Asn Leu His Ala Tyr Val Arg Arg Ser Leu His Arg His		
	275	280
		285
Tyr Gly Ser Glu Tyr Ile Asn Leu Asp Gly Pro Ile Pro Ala His Leu		
	290	295
		300
Leu Gly Asn Met Trp Ala Gln Thr Trp Ser Asn Ile Tyr Asp Leu Val		
305	310	315
		320
Ala Pro Phe Pro Ser Ala Pro Asn Ile Asp Ala Thr Glu Ala Met Ile		
	325	330
		335
Lys Gln Gly Trp Thr Pro Arg Arg Ile Phe Lys Glu Ala Asp Asn Phe		
	340	345
		350
Phe Thr Ser Leu Gly Leu Leu Pro Val Pro Pro Glu Phe Trp Asn Lys		
	355	360
		365
Ser Met Leu Glu Lys Pro Thr Asp Gly Arg Glu Val Val Cys His Pro		
	370	375
		380
Ser Ala Trp Asp Phe Tyr Asn Gly Lys Asp Phe Arg Ile Lys Gln Cys		
385	390	395
		400
Thr Ser Val Asn Met Glu Asp Leu Val Ile Ala His His Glu Met Gly		
	405	410
		415
His Ile Gln Tyr Phe Met Gln Tyr Lys Asp Leu Pro Val Thr Phe Arg		
	420	425
		430
Glu Gly Ala Asn Pro Gly Phe His Glu Ala Ile Gly Asp Ile Met Ala		
	435	440
		445

4/5

Leu Ser Val Ser Thr Pro Lys His Leu Tyr Ser Leu Asn Leu Leu Ser
 450 455 460

Thr Glu Gly Ser Gly Tyr Glu Tyr Asp Ile Asn Phe Leu Met Lys Met
 465 470 475 480

Ala Leu Asp Lys Ile Ala Phe Ile Pro Phe Ser Tyr Leu Ile Asp Gln
 485 490 495

Trp Arg Trp Arg Val Phe Asp Gly Ser Ile Thr Lys Glu Asn Tyr Asn
 500 505 510

Gln Glu Trp Trp Ser Leu Arg Leu Lys Tyr Gln Gly Leu Cys Pro Pro
 515 520 525

Val Pro Arg Ser Gln Gly Asp Phe Asp Pro Gly Ser Lys Phe His Val
 530 535 540

Pro Ala Asn Val Pro Tyr Val Arg Tyr Phe Val Ser Phe Ile Ile Gln
 545 550 555 560

Phe Gln Phe His Glu Ala Leu Cys Arg Ala Ala Gly His Thr Gly Pro
 565 570 575

Leu His Lys Cys Asp Ile Tyr Gln Ser Lys Glu Ala Gly Lys Leu Leu
 580 585 590

Ala Asp Ala Met Lys Leu Gly Tyr Ser Lys Pro Trp Pro Glu Ala Met
 595 600 605

Lys Leu Ile Thr Gly Gln Pro Asn Met Ser Ala Ser Ala Met Met Asn
 610 615 620

Tyr Phe Lys Pro Leu Thr Glu Trp Leu Val Thr Glu Asn Arg Arg His
 625 630 635 640

Gly Glu Thr Leu Gly Trp Pro Glu Tyr Asn Trp Ala Pro Asn Thr Ala
 645 650 655

Arg Ala Glu Gly Ser Thr Ala Glu Ser Asn Arg Val Asn Phe Leu Gly
 660 665 670

Leu Tyr Leu Glu Pro Gln Gln Ala Arg Val Gly Gln Trp Val Leu Leu
 675 680 685

Phe Leu Gly Val Ala Leu Leu Val Ala Thr Val Gly Leu Ala His Arg
 690 695 700

5/5

Leu Tyr Asn Ile Arg Asn His His Ser Leu Arg Arg Pro His Arg Gly
705 710 715 720

Pro Gln Phe Gly Ser Glu Val Glu Leu Arg His Ser Leu Ala His Arg
725 730 735

Leu Tyr Asn Ile Arg Asn His His Ser Leu Arg Arg Pro His Arg Gly
740 745 750

Pro Gln Phe Gly Ser Glu Val Glu Leu Arg His Ser
755 760

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/13851

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K38/46, A61K45/00, A61P15/00, A61P25/28, A61P31/04,
A61P43/00, C12N9/64, C12N15/57

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K38/46, A61K45/00, A61P15/00, A61P25/28, A61P31/04,
A61P43/00, C12N9/64, C12N15/57

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), WPI, JOIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X P, A	Hajime KONDO, 'Mouse Seishoku Saibo GPI Anchor-gata Tanpakushitsu Yuri Inshi no Tanri to Kino Kaiseki', Seishoku Saibo no Seigyo Kiko to Hassei Kogaku, Heisei 11-14 Nendo, No.11234101, pages 69 to 72	1-4 5-10
A	WO 91/354 A1 (INSERM INST.NAT.SANTE & RECH.MED.), 10 January, 1991 (10.01.91), Full text & FR 2649412 A1 & EP 432254 A1 & JP 4-500612 A & CA 2035888 A1 & US 5801040 A	1-7
A	JP 2001-316287 A (BML, Inc.), 13 November, 2001 (13.11.01), Full text (Family: none)	1-7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
03 February, 2004 (03.02.04)

Date of mailing of the international search report
24 February, 2004 (24.02.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/13851

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 95/32725 A1 (QUEEN MARY & WESTFIELD COLLEGE), 07 December, 1995 (07.12.95), Full text & AU 9525345 B & EP 760672 A1 & US 6011015 A & JP 2001-506225 A	1-7
X	JASPARD, E. et al., 'Differences in the properties and enzymatic specificities of the two active sites of angiotensin I-converting enzyme(kininase II). Studies with bradykinin and other natural peptides.', J.Biol.Chem., 1993, Vol.268, No.13, pages 9496 to 9503; full text; page 9497, left column, lines 9 to 16; Figs. 1, 3, 4; table I-V	8-10
X	WEI, L. et al., 'The two homologous domains of human angiotensin I-converting enzyme are both catalytically active.', J.Biol.Chem., 1991, Vol.266, No.14, pages 9002 to 9008; full text; page 9003, lower left column, 12th line from the bottom to 7th line from the bottom; Figs. 1 to 5; table I-IV	8-10
X	WEI, L. et al., 'The two homologous domains of human angiotensin I-converting enzyme interact differently with competitive inhibitors.', J. Biol.Chem., 1992, Vol.267, No.19, pages 13398 to 13405; full text; page 13399, left column, lines 26 to 29; Fig. 1; table I	8-10
A	PANG, S. et al., 'Roles of the juxtamembrane and extracellular domains of angiotensin-converting enzyme in ectodomain shedding.', Biochem.J., 2001, Vol.358(Pt 1), pages 185 to 192	1
A	MARCIC, B. et al., 'Replacement of the transmembrane anchor in angiotensin I-converting enzyme (ACE) with a glycosylphosphatidylinositol tail affects activation of the B2 bradykinin receptor by ACE inhibitors.', J.Biol.Chem., 2000, Vol.275, No.21, pages 16110 to 16118	1
A	PANG, S. et al., 'The ectodomain of angiotensin converting enzyme does not dictate sensitivity to secretase cleavage.', Biochemical Society transactions, 2000, Vol.28, No.5, p.A262	1
A	Chem.Abstr., 1995, Vol.123, abstract No.330713 abstract & ISRAEL, A. et al., 'Angiotensin II receptor subtypes and phosphoinositide hydrolysis in rat adrenal modulla.', Brain Research Bulletin, 1995, Vol.38, No.5, 441-446	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/13851

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Chem.Abstr., 1993, Vol.118, abstract No.252487 abstract & RAIZADA, M. et al., 'Increased angiotensin II type-1 gene expression in neuronal cultures from spontaneously hypertensive rats.', 1993, Vol.132, No.4, pages 1715 to 1722	1
A	Chem.Abstr., 1989, Vol.113, abstract No.126431 abstract & ROBINSON-WHITE, A.J. et al., 'Inhibition of inositol phospholipid hydrolysis in endothelial cells by pentobarbital.', European J.Pharmacol., Molecular Pharmacology Section, 1989, Vol.172, No.3, pages 291 to 303	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/13851

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
(See extra sheet.)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/13851

Continuation of Box No. II of continuation of first sheet(1)

<Unity of invention>

- [1] Claims 1 to 7 (referred to as invention group 1).
- [2] Claims 8 to 10 (referred to as invention group 2).

Angiotensin convertase mutants having an amino acid mutation of inactivating the peptidase activity transferred thereinto, in which one or more amino acid residues in the amino acid sequence His Glu Met Gly His have been substituted by other amino acid residue(s), are described in any of the following documents cited in the Box C in this report:

•JASPARD E., et al. "Differences in the properties and enzymatic specificities of the two active sites of angiotensin I-converting enzyme (kininase II). Studies with bradykinin and other natural peptides." J. Biol. Chem., 1993, vol.268, no.13, p.9496-9503, full text, page 9497, left column, lines 9 to 16, Figs. 1, 3, 4, TABLE I-V

•WEI, L. et al., "The two homologous domains of human angiotensin I-converting enzyme are both catalytically active." J. Biol. Chem., 1991, vol.266, no.14, p.9002-9008, full text, page 9003, lower left column, lines 12 to 7 from the bottom, Figs.1-5, TABLE I-IV

•WEI, L. et al., "The two homologous domains of human angiotensin I-converting enzyme interact differently with competitive inhibitors." J. Biol. Chem., 1992, vol.267, no.19, p.13398-13405, full text, page 13399, left column, lines 26 to 29, Figs. 1, Table I

Accordingly, the inventions having, as the matter specifying the invention, these angiotensin convertase mutants in the above-described invention groups (namely, the inventions according to claims 1 to 7 in the invention group 1 and the inventions according to claims 8 and 9 in the invention group 2) cannot be considered as having a special technical feature in common. Such being the case, these groups of inventions are not considered as being so linked as to form a single general inventive concept.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K38/46, A61K45/00, A61P15/00, A61P25/28, A61P31/04, A61P43/00, C12N9/64, C12N15/57

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K38/46, A61K45/00, A61P15/00, A61P25/28, A61P31/04, A61P43/00, C12N9/64, C12N15/57

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPlus (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), WPI, JOIS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X P, A	近藤玄 ‘マウス生殖細胞GPIアンカー型蛋白質遊離因子の単離と機能解析’ 生殖細胞の制御機構と発生工学 平成11-14年度 No. 11234101 p. 69-72	1-4 5-10

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

03.02.04

国際調査報告の発送日

24.2.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

大久保元浩

4C

8828

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 91/354 A1 (INSERM INST NAT SANTE & RECH MED) 1991.01.10 文献全体 & FR 2649412 A1 & EP 432254 A1 & JP 4-500 612 A & CA 2035888 A1 & US 5801040 A	1-7
A	JP 2001-316287 A (株式会社ビー・エム・エル) 2001.11.13 文献全体 (ファミリーなし)	1-7
A	WO 95/32725 A1 (QUEEN MARY & WESTFIELD COLLEGE) 1995.12.07 文献全体 & AU 9525345 B & EP 760672 A1 & US 601101 5 A & JP 2001-506225 A	1-7
X	JASPARD, E. et al. 'Differences in the properties and enzymatic specificities of the two active sites of angiotensin I-converting enzyme(kininase II). Studies with bradykinin and other natural peptides.' J. Biol. Chem., 1993, vol.268, no.13, p.9496-9503 文献全体、p.9497左欄第9-16行、FIG.1-3-4、TABLE I-V	8-10
X	WEI, L. et al. 'The two homologous domains of human angiotensin I - converting enzyme are both catalytically active.' J. Biol. Chem., 1991, vol.266, no.14, p.9002-9008 文献全体、p.9003左欄下から第12-7行、FIG.1-5、TABLE I-IV	8-10
X	WEI, L. et al. 'The two homologous domains of human angiotensin I - converting enzyme interact differently with competitive inhibitors.' J. Biol. Chem., 1992, vol.267, no.19, p.13398-13405 文献全体、p.13399左欄26-29行、FIG.1、TABLE I	8-10

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	PANG, S. et al. 'Roles of the juxtamembrane and extracellular domains of angiotensin-converting enzyme in ectodomain shedding.' Biochem. J., 2001, vol.358(Pt 1) p.185-192	1
A	MARCIC, B. et al. 'Replacement of the transmembrane anchor in angiotensin I-converting enzyme (ACE) with a glycosylphosphatidylinositol tail affects activation of the B2 bradykinin receptor by ACE inhibitors.' J. Biol. Chem., 2000, vol.275, no.21, p.16110-16118	1
A	PANG, S. et al. 'The ectodomain of angiotensin converting enzyme does not dictate sensitivity to secretase cleavage.' Biochemical Society transactions, 2000, vol.28, no.5, p.A262	1
A	Chem. Abstr., 1995, vol.123, abstract no.330713 abstract & ISRAEL, A. et al. 'Angiotensin II receptor subtypes and phosphoinositide hydrolysis in rat adrenal medulla.' Brain Research Bulletin, 1995, vol.38, no.5, p.441-446	1
A	Chem. Abstr., 1993, vol.118, abstract no.252487 abstract & RAIZADA, M. et al. 'Increased angiotensin II type-1 gene expression in neuronal cultures from spontaneously hypertensive rats.' 1993, vol.132, no.4, p.1715-1722	1
A	Chem. Abstr., 1989, vol.113, abstract no.126431 abstract & ROBINSON-WHITE, A. J. et al. 'Inhibition of inositol phospholipid hydrolysis in endothelial cells by pentobarbital.' European J. Pharmacol., Molecular Pharmacology Section, 1989, vol.172, no.3, p.291-303	1

第 I 欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第 1 ページの 2 の続き)

法第 8 条第 3 項 (PCT 17 条 (2) (a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

第 II 欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第 1 ページの 3 の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

(特別ページ参照)

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

<単一性について>

- [1] 請求の範囲 1-7 (... 発明群 1 とする)
- [2] 請求の範囲 8-10 (... 発明群 2 とする)

ペプチダーゼ活性を失活させるアミノ酸変異を導入した変異型アンギオテンシン変換酵素であって、アミノ酸配列中の His Glu Met Gly His 配列におけるいずれか1以上のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換したものは、本報告中のC欄で挙げた文献である

・JASPARD, E. et al. 'Differences in the properties and enzymatic specificities of the two active sites of angiotensin I-converting enzyme(kininase II). Studies with bradykinin and other natural peptides.' J. Biol. Chem., 1993, vol.268, no.13, p.9496-9503 文献全体、p.9497左欄第9-16行、FIG.1-3-4、TABLE I-V

・WEI, L. et al. 'The two homologous domains of human angiotensin I - converting enzyme are both catalytically active.' J. Biol. Chem., 1991, vol.266, no.14, p.9002-9008 文献全体、p.9003左欄下から第12-7行、FIG.1-5、TABLE I-IV

・WEI, L. et al. 'The two homologous domains of human angiotensin I - converting enzyme interact differently with competitive inhibitors.' J. Biol. Chem., 1992, vol.267, no.19, p.13398-13405 文献全体、p.13399左欄26-29行、FIG.1、TABLE I

のいずれかに記載されている。

よって、少なくとも、両発明群のうち上記変異型アンギオテンシン変換酵素を発明特定事項とするもの同士、即ち、発明群1のうち請求の範囲1-7に係る発明と、発明群2のうち請求の範囲8、9に係る発明、とは、特別な技術的特徴を共有しているとはいえないから、これらの発明群は単一の一般的発明概念を形成するように連関しているとは認められない。